

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB de BLIDA
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de master en biologie

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Thème

**Effet de l'incorporation de la spiruline (*Arthrospiraplatensis*) sur
la cinétique de la croissance et le pouvoir acidifiant des bactéries
pseudolactique**

Présenté par :

M^{elle} ZEHARAOUI BachiraImene

Devant le jury composé de :

.....	Président	USDB
.....	Examinatrice	USDB
.....	Examinatrice	USDB
M ^{me} Doumanji A.	MCA	Promotrice	USDB
M ^{me} Chahdan S.	DUES	Co- promoteur	ENS Kouba

Promotion 2012-2013

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des symboles et des abréviations abréviations

Introduction	1
Partie I : Etude bibliographique.....	2
Chapitre I : La spiruline.....	2
I.Définition.....	2
II. Historique	2
III. Caractéristique de la spiruline	2
VI. Taxonomie de la spiruline.....	3
V. Aspects et intérêts nutritionnelles de la spiruline.....	3
V.1. Protéines et acides aminés.....	4
V.2. Les lipides et les acides gras.....	5
V.3. Glucides et polysaccharides.....	6
V.4. Les vitamines.....	6
V.5. Les pigments.....	7
V.6. Les sels minéraux et les oligoéléments.....	7
IV. Les activités thérapeutiques de la spiruline.....	8
IV.1. Renforcement du système immunitaire.....	8
IV.2. La Spiruline en tant que complément alimentaire	8
IV.3.Effets sur la flore intestinale	9
IV.4. Activité antivirale.....	9

Chapitre II : Les bifidobacteries.....	09
I. Définition.....	10
II. Caractères généraux	10
II.1. Classification	11
III. Métabolisme	11
IV. Colonisation microbienne du tube digestif des nourrissons	12
V. Les probiotiques	12
V.1. Le mécanisme d'action	13
V.2. Les principaux effets bénéfiques de probiotiques	14
VI. Les prébiotiques	15
VI.1 Définition	15
VI.2. Le symbiotique	15
Partie II : Partie expérimentale.....	16
Chapitre I : Matériel et méthodes	17
IV. Matériel.....	18
IV.1. Matériel biologiques.....	18
VI.1.2. Appareillages et verreries.....	18
V. Méthodes.....	19
V.1. Enquête sur les différents types d'allaitement.....	19
V.2. Isolement de bifidobactéries à partir des selles de nourrissons	19
V.3 Contrôle de pureté de la souche bifidobactéries.....	22
V.3.1 Identification biochimique de la souche bifide.....	22
V.3.2. Conservation de la souche bifide.....	23
V.4. Contrôle bactériologique et physicochimique du lait infantile.....	23
V.4.1. Analyses physicochimique de l'échantillon	24
1. détermination de l'extrait sec total (EST).....	24
2. Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH)	24

3. Mesure de l'acidité titrable.....	24
4. Détermination de la teneur en matière grasse.....	25
V.4.2. Analyses microbiologiques.....	25
1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.....	25
1. Recherche et dénombrement des germes aérobies à 30 °C.....	26
2. recherches et dénombrement des coliformes (totaux et fécaux).....	26
3. recherches et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylocoque doré).....	27
4. Recherche et dénombrement de <i>Salmonella</i>	28
5. recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> Sulfito-réducteurs.....	29
6- recherche et dénombrement des levures et moisissure.....	29
V.5.Suivi de l'acidification et de la croissance de <i>Bifidobacterium infantis</i> dans le lait écrémé reconstitué et dans le lait additionné de spiruline.....	30
V.5.1 La reconstitution du lait infantile adapté 1 ^{er} âge.....	30
V.6.Étude de la résistance de <i>Bifidobacterium infantis</i> aux Antibiotiques.....	33
V.6.1.Détermination des catégories S/I/R.....	34
V.7.Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ).....	35
Chapitre II : Résultats et discussion	37
I. Résultats.....	38
I.1 Résultats d'Enquête sur les différents types d'allaitement.....	38
I.2. Contrôle de la qualité physicochimique de lait infantile.....	38
I.3. Contrôle de la qualité bactériologie de lait infantile.....	39
I.4.Confirmation de l'identification de la souche <i>Bifidobacterium infantis</i>	40
I.5. Evolution de pH du lait infantile seul ou enrichi lors de la fermentation	41
I.6 Evolution des comptes de <i>Bf.infantis</i> dans le lait adapté 1 ^{er} âge (Célia) seul ou enrichi avec la souche Spiruline.....	43

I.7 Les résultats de la cinétique de la croissance suivi toutes les 2 heures et Après 24 heures.....	45
I.8. Résultats de la sensibilité de la souche <i>Bifidobacterium infantis</i> aux antibiotiques.....	45
II. Discussion.....	48
Conclusion	51
Références bibliographiques.....	54
Annexes	

Abstract

Spirulina confirms its role as a nutrient, its exceptional nutritional value has a significant therapeutic interest. It has an effect on the intestinal flora. This study is intended to demonstrate the influence of *Spirulina* on the growth of *Bifidobacterium*.

We have used *Spirulina platensis* with bifidobacteria contained in the infant milk in order to augment their effectiveness because these later play an important role in the regulation of the intestinal flora.

The *Spirulina* has protein levels revealed a significant $56,2 \text{ g/L} \pm 0,54$. At the end of the study, the enrichment of infant formula (Célio 1er age) fermented with a strain of *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium infantis*) with *Spirulina* due to 1% significantly improved the acidification speed of bifid strain ($V_{pH} = 97,10^{-2}$) after 24 hours of fermentation, and accelerates the growth rate from 0.38 to 0.20 min^{-1} reducing the time of generation from 4.88 to 2.60 mn.

Keywords: *Bifidobacterium infantis*, *Spirulina*, Infant formula, Acidifying power and growth,

ملخص

السيبرولينا تؤكد دورها بوصفها أليكمنت ، ذات قيمة غذائية استثنائية لديها مصلحة كبيرة علاجية .لديها ايضا تأثير على عصابات المعوية.تهدف هذه الدراسة إلى إظهار تأثير السيبرولينا على Bifidobacterie.

الهدف من هذه الدراسة توضيح تأثير السيبرولينا على نمو bifidobacteria و القدرة المحمضة .

لقد استعملنا *Spirulina platensis* مع bifidobacteria الموجودة في حليب الرضع (سيليا) السن الاول لانهما يلعبان دورا هاما في تنظيم العصابات المعوية .

وقد أظهرت التحليلات الفيزيائية والكيميائية لسيبرولينا بأن البروتينات تمثل نسبة معتبرة هي $56,2 \pm 0,54$ / غرام في هذه الدراسة وعند اثناء حليب الاطفال لسن الاولى بالسيبرولينا بمقدار 1% نلاحظ انه قد حسن بشكل ملحوظ سرعة الحموضة لسلسلة bifide , ($\text{pH} = 97,10^{-2}$) بعد 24 ساعة من التخمر وايضا قد سرع في معدل النمو من 0,38 الى 0,20 د⁻¹ , وقد خفض من وقت الانتاج من 4,88 الى 2,60

الكلمات المفتاحية: *Bifidobacterium infantis*, السيبرولينا , حليب الرضع , قدرة الحموضة و النمو

Résumé

La spiruline confirme son rôle d'alicament, sa valeur nutritive exceptionnelle présente un intérêt thérapeutique non négligeable. Elle possède un effet sur la flore intestinale. Cette étude a pour but de démontrer l'influence de la spiruline sur la croissance des bifidobactéries. Et le pouvoir acidifiant.

Nous avons utilisé la souche *Spirulina platensis* au profit des bifidobactéries contenues dans le lait infantile Célia 1^{er} âge afin d'augmenter leur nombre car ces dernières jouent un rôle important dans la régulation de la flore intestinale.

La spiruline a révélé un taux de protéines important soit $56,2 \pm 0,54$ g/. Au terme de l'étude, l'enrichissement du lait infantile (Célia 1^{er} âge) fermenté avec une souche de bifidobacterium (*Bifidobacterium infantis*) avec la spiruline en raison de 1% a amélioré significativement la vitesse d'acidification de la souche bifide ($V_{pH} = 97,10^{-2}$) après 24 h de fermentation, et accélère son taux de croissance de 0,38 à 0,20 mn⁻¹ et réduit le temps de génération de 4,88 à 2,60 mn.

Mots clés: *Bifidobacterium infantis*, Spiruline, Lait infantile, Pouvoir acidifiant et croissance

Liste des figures

Figure n°01 : <i>Arthrospiraplatensis</i> , variété Lonar(Tabutin et al .,2002).....	03
Figure n°02 : Aspect microscopique de <i>Bifidobacteriumadolescentis</i> (Leveau et Buix,1993).....	10
Figure n°03 : Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir des selles de nourrisson.....	21
Figure n°04 :Identification biochimique de la souche <i>Bifidobacteriuminfantis</i> par galerie API 20E.....	23
Figure n°05 : La reconstitution de lait adapté 1 ^{er} âge.....	30
Figure n°06 : Suivi de pouvoir acidifiant et de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sp dans le lait écrémé seul et dans le lait additionné de spiruline.....	32
Figure n°07 : Activité inhibitrice d'antibiotique sur la souche <i>Bifidobacteriuminfantis</i>	34
Figure n°08 : Présentations de différents types d'allaitement.....	38
Figure n°09 :Evolution du pH du lait infantile (Célia) 1 ^{er} âge seul ou enrichi avec la Spiruline fermentée par <i>Bifidobacteriuminfantis</i>	42
Figure n°10 :Cinétique de croissance de <i>B.finfantis</i> cultivé dans le lait infantile (Célia) 1 ^{er} âge seul et enrichi avec la spiruline.....	44
Figure n°11 : Spectre d'action de quelques antibiotiques vis-à-vis <i>bifidobacteriuminfantis</i>	46
Annexe :	
Figure n°12 : Recherche et dénombrement des germes aérobies Mésophiles totaux	
Figure n°13 : Recherche et dénombrement des Coliformes en milieu solide	
Figure n°14 : Recherche et dénombrement de Staphylococcus aureus	
Figure n°15 : Recherche de spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs Et de Clostridium perfringens	
Figure n°16 : Recherche et dénombrement de Levures et Moisissures	

Figure n°17: Recherche et dénombrement des salmonelles des souches bifides

Figure n° 18: La spiruline

Figure n°19 : lait infantile (Célia 1^{er} âge)

Figure n°20 : La galerie Api 20 E

Figure n°21 : Autoclave

Figure n°22 : Compteur de colonies

Figure n°23 : Etuve à 37°C

Figure n°24 : Microscope optique

Figure n°25 : Bec bunsen

Figure n°26 : Bain Marie

Figure n°27: Incubateur

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition de la spiruline (<i>Spirulina maxima</i>) en acides aminés Pour 100g.....	4
Tableau 2 : Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de spiruline	5
Tableau 3 : Teneurs en pigments exprimées en mg 100g de matière sèche de <i>Spirulina platensis</i>	6
Tableau 4 : Teneur en minéraux dans 10g de spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche.....	7
Tableau 05: Les principaux microorganismes à effets probiotique.....	12
Tableau 06: Les différents antibiotiques utilisés.....	35
Tableau 07 : Les résultats d'analyses physicochimique	49
Tableau 08: Les résultats des analyses bactériologiques effectuées sur le lait infantile « Célia 1 ^{er} âge »	40
Tableau 09 : Résultats des tests biochimiques par la galerie API 20 E de la souche <i>Bifidobacterium infantis</i>	41
Tableau 10: Résultats de l'évolution de l'acidification du lait adapté 1 ^{er} âge (Célia) seul et enrichi avec la Spiruline séchée fermentée par <i>Bifidobacterium infantis</i>	42
Tableau 11: Détermination des comptes moyens de <i>Bf. Infantis</i> cultivé dans le lait infantile seul 1 ^{er} âge (Célia).....	43
Tableau 12: Déterminations des comptes moyens de <i>Bf. Infantis</i> cultivé dans le lait infantile 1 ^{er} âge (Célia). Enrichi avec la spiruline.....	44
Tableau 13 : Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (v pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (µ) de <i>Bifidobacterium infantis</i> cultivé dans le lait adapté 1 ^{er} âge seul ou enrichi avec de la spiruline.	45
Tableau 14 : Résultats de la sensibilité de la souche <i>Bifidobacterium infantis</i> aux antibiotiques.....	46

Annexes

Tableau 15 : Composition de lait adapté 1^{er} âge (Célia) indiquer sur l’emballage

Tableau 16 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E

Introduction

La spiruline dont le nom scientifique est *Spirulina* sp. Ou *Arthrospira* sp. est une algue bleue microscopique qui se développe dans les régions tropicales et subtropicales. Apparue sur la terre il y a 3,5 milliard d'années, elle figure aujourd'hui parmi les êtres vivants les plus vieux de notre planète et attire de plus en plus l'attention des scientifiques. Elle possède de multiples utilités: Agro-alimentaire, pharmaceutique, écologique et biotechnologique (Charpy et al., 2008).

De nombreuses études ont montré des effets positifs de sa consommation sur la santé humaine et animale (Fox, 2002).

La spiruline est une algue bleu-vert, depuis des années, considérée comme un complément alimentaire sain et efficace par un nombre grandissant de personnes (Simpore et al., 2006). La spiruline est utilisée dans la lutte contre la mal nutrition car nul autre aliment ne peut apporter jusqu'à 70% de protéines, autant de minéraux, vitamines, anti-oxydant et acides gras poly-insaturés. De ces qualités découlent pour nous un grand intérêt de son utilisation dans l'alimentation infantile. Des études transversales ont montré que la flore colique du nourrisson sous allaitement maternel est dominée par les bifidobactéries tandis que les entérobactéries prédominent chez l'enfant nourri au lait artificiel (Charpy et al., 2008).

Tsuchihashi a montré en 1987 que l'ajout de 5% de la spiruline dans l'alimentation augmentait de 3 fois la population des *Lactobacillus* des intestins de rats. Chez les humains, les *Lactobacillus* sont connus pour leurs 3 fonctions majeurs : ils facilitent la digestion des nutriments, protègent contre les infections et stimulent le système immunitaire. La spiruline agit comme aliment fonctionnel, nourrissant la flore intestinale, surtout le lactobacille et le bifidus. Le maintien d'une population saine de ces bactéries dans l'intestin réduit les problèmes provoqués par des éléments pathogènes comme *E. Coli* et *Candida albicans*.

Le but de ce présent travail est l'étude de l'influence *in vitro* de la spiruline sur la croissance de la flore intestinale en particulier sur les bifidobactéries. La première étape de cette étude consiste à réaliser le contrôle microbiologique et physicochimique du lait infantile (Célia 1^{er} âge). La seconde étape est orientée vers la caractérisation de la souche *Bifidobacterium infantis* dans le lait infantile 1^{er} âge seul et enrichi en spiruline à raison de 1%. Deux paramètres technologiques ont fait l'objet de cette étude soit le pouvoir acidifiant (pH) et la cinétique de croissance (biomasse).

I. Historique

Lorsque les Européens abordèrent en Amérique centrale, ils découvrirent que les Aztèques tiraient du Grand Lac Texcoco, situé près de Mexico, une sorte de «boue» bleue à haute valeur nutritive, «le tecuitlatl» (**Perez, 1997**).

En Afrique, certaines tribus du Sahara, consomment depuis bien longtemps la spiruline, puisée dans des lacs et mares où elle croît à l'état naturel, sous forme de galettes nommées "Di hé" (**Vidal, 2008**).

La spiruline, bien que déjà décrit par **Wittrock et Nordstedt** en 1844, ne fut vraiment redécouverte qu'en 1940 au Tchad par un botaniste français du nom de Dangeard.

En Algérie, la production de la Spiruline reste au stade artisanal et expérimental. L'unique producteur connu à ce jour est Mr Hiri Abdelkader qui connaît parfaitement le processus de production de cette espèce d'algue. Il dispose d'un bassin installé à Tamanrasset d'une superficie d'environ 20m² et produit 20kg de spiruline sèche par an. Plusieurs avantages peuvent s'offrir pour la production de la Spiruline en Algérie notamment les conditions climatiques du Sud du pays (**Vidal, 2008**)

II. Caractéristique de la spiruline

La spiruline est une cyanobactérie. Elle appartient donc au domaine des bactéries et se classe parmi les bactéries Gram négatives (**Charpy et al., 2008**)

Les cyanobactéries peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires ; dans ce dernier cas, leurs cellules s'arrangent en amas de type de colonies ou, le plus souvent, en filament composé de cellules alignées (ces filaments sont appelés trichomes). Ces trichomes sont hélicoïdales, observables uniquement en milieu liquide, et ils sont caractéristiques du genre. C'est d'ailleurs de là que la spiruline tient son nom (**Charpy et al., 2008**)

La spiruline est considérée comme une algue bleu-vert planctonique microscopique souvent de forme spiralée (**Perez, 1997**).

- ✚ Son habitat aquatique
- ✚ La présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène
- ✚ Sa morphologie proche de celle des algues
- ✚ Sa couleur liée à sa teneur en pigment bleu (phycocyanine) et vert (Chlorophylle)

C'est un des plus primitifs organismes apparus sur la Terre il ya plus de 3,5 milliard d'années (Perez, 1997).

La spiruline est une cyanophycée microscopique d'une longueur moyenne d'environ 250µm. Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12µm de diamètre non ramifié et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires (figure 1) (Tabutin et al .,2002).

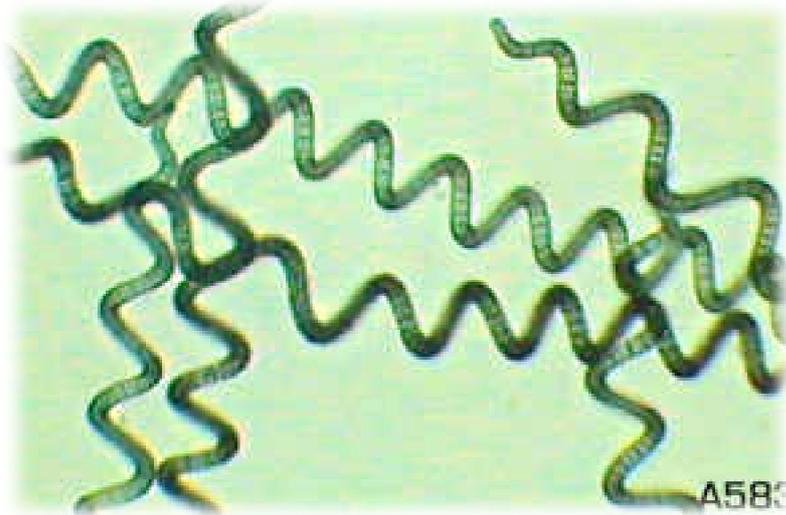


Figure n°01 : *Arthrospiraplatensis*(100)(Tabutin et al .,2002)

III. Taxonomie de la spiruline

La classification de la spiruline est comme suit :

- ✚ Règne : Monera
- ✚ Sous règne : Procaryota
- ✚ Phylum : Cyanophyta
- ✚ Classe : Cyanophyceae
- ✚ Ordre : Nostocales
- ✚ Famille : Oscillatoriaceae
- ✚ Genre : *Arthrospira*
- ✚ Espèce : *Arthrospiraplatensis*

Espèce et sous- espèce : *Arthrospiraplatensis*, *A. maxima*, *A. toliara*, *A. lonar*, *A. craterMexicana*, *A. paracas* ..etc (Vidalo, 2008).

IV. intérêts nutritionnels de la spiruline

La spiruline présente des propriétés thérapeutiques. Elle renferme plusieurs molécules ayant fait l'objet d'études pour leurs activités biologiques. C'est d'abord L'impressionnante teneur en protéines de la spiruline qui a attiré l'attention des chercheurs comme des industriels. Par la suite, le nombre de propriétés particulièrement intéressantes sur le plan nutritionnel sont apparues : composition protéique équilibrée, présence de lipides essentiels rare ainsi que de nombreux minéraux et vitamines (**flaquet,1996**).

IV.1. Protéines et acides aminés

La teneur en protéines de la spiruline est élevée. Elle représente 60% à 70% de matière sèche (**Fox, 1999**) et possède la plupart des acides aminés dont les acides aminés essentiels (**Bujard et al., 1970**). Les teneurs des acides aminés sont présentés au tableau 1(**Annexes 01**)

IV.2. Les lipides et les acides gras

IV.2.1. Les lipides totaux

Le pourcentage des lipides totaux est compris entre 6 et 13% de poids sec en spiruline(**Flaquet,1996**).

Ils se subdivisent en deux fractions : une fraction saponifiable ou « acide gras » (83%) et une fraction insaponifiable (17%) (**Clément ,1975**).

IV.2.2. Les acides gras

L'acide gamma- linoléique constitue jusqu'à 40% des acides gras de la spiruline, qui figure parmi les meilleurs sources connues d'acides gamma-linoléique(**Flaquet, 2006**).

Cette présence mérite d'être soulignée du fait de sa rareté dans les aliments courants et que c'est un précurseur de médiateur chimique des réactions inflammatoires et immunitaires (**Flaquet, 2006**).

La spiruline est également riche en sulfolipides, qui intéressent les chercheurs pour leur activité protectrice contre des infections virales. Le composant lipide sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), par exemple, a démontré par expérience in vitro sa capacité à inhiber la transcriptase inverse du VIH (**Kiet et al., 2006**).

IV.3. Glucides et polysaccharides

Les glucides représentent environ 15% à 25% de la matière sèche de la spiruline, Elle est spirulane calcique (Ca-SP) et le spirulane sodique (Na-SP)(**Flaquet, 2006**).

Ces polysaccharides présentent d'intéressantes propriétés anticoagulantes immunostimulantes

et antivirales (**Flaquet, 2006**).

IV.4. Les vitamines

Les vitamines jouent un rôle important dans le développement harmonieux et le maintien en bon équilibre de l'organisme humain dans son ensemble. La spiruline possède la vitamine A (sous forme de précurseur : le β -carotène en quantité particulièrement élevée, 15 fois plus carotte), le complexe vitaminique B (B1, B2, B3, B6, B9, B12). La composition de la spiruline en vitamines est représentée dans le tableau 2 (Annexe 01)

IV.5. Pigments

La spiruline contient des chlorophylles -a (typique des végétaux), des caroténoïdes dont le principal est le β -carotène et des phycobiliprotéines tels la phycocyanine et la phycoérythrine. Ces pigments sont responsables de la couleur caractéristique de certaines espèces.

Les teneurs en pigments de la *Spirulina platensis* apparaissent dans le tableau 3 (Annexe01)

IV.6. Sels minéraux et les oligoéléments

La spiruline est naturellement riche en certains minéraux essentiels particulièrement importants lors de la malnutrition. Il est utile de mentionner qu'il est possible de jouer sur les intrants et ainsi de facilement modifier le contenu en acide gras ou en certains minéraux (**Johnson et Shubert,1986**).

IV.6.1. Fer

La spiruline naturelle a des teneurs en fer allant jusqu'à 500mg/K bien que des valeurs supérieures à 1000mg/Kg aient été trouvées (Campanella, 1999). Le fer avec sa biodisponibilité élevée, fait de la spiruline une source de fer particulièrement adéquate pour les femmes enceintes souvent anémiées (**Johnson et Shubert,1986**).

IV.6.2. Zinc

La spiruline ne contient généralement que des traces de zinc (21-40mg/g) mais peut facilement en être enrichie (**Flaquet et Hurni,2006**)

IV.6.3. Magnésium

La spiruline est naturellement riche en magnésium et la biodisponibilité de celui-ci pour l'homme a été démontrée (**Flaquet et Hurni,2006**)

V. La production de la Spiruline

La production de la spiruline se fait à plusieurs échelles : artisanale, semi-industrielle et industrielle. Les éléments de différenciation de ces modes de production sont la surface totale des bassins de culture et leur surface unitaires, les moyens et matériaux utilisés, les degrés de technologie, les objectifs le processus de fabrication de la spiruline passe cependant par les mêmes étapes obligatoires.

V.1. Production artisanale

Les fermes artisanales de Spiruline sont des systèmes d'exploitation nécessitant un faible apport en énergie. La surface des bassins est très variable, n'excèdent pas certains de m² pour une surface totale inférieure à 3000m². Les moyens mis en œuvre peuvent être rustiques, faisant appel au bon sens et à l'ingénierie. (Charpy et al.,2008)

L'eau utilisée est nécessairement celle du puits villageois le plus proche. Les bassins sont soumis au gré des intempéries, pluies, vents de sable, déjections d'oiseaux... la production est exclusivement dévolue à la consommation locale. (Vidal,2008)

La plus grande partie de la spiruline produite dans le monde est issue de bassins artisanaux, initiés, construits et financés par des programmes humanitaires extrêmement actifs et efficaces.) (Charpy et al.,2008)

V.1.1. Méthodes de production artisanale

➤ Paramètre de production

- **Température**

Doit se situer entre 20 et 37°C. au-dessous de 20°C, la croissance est stoppée.

- **La lumière**

Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à la photolyse du micro algue.

Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donne la croissance optimale.

En lumière et agitation faible, la croissance est lente, mais la pigmentation plus marquée, c'est-à-dire que la couleur est vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaît (Fox,1999).

- **CO₂**

Etant moins soluble dans l'eau chaud que dans l'eau froid, l'élévation de la température réduit son taux, limitant la croissance. Une température trop basse réduit aussi la croissance. Donc, dans la zone de 34 à 40, l'addition de CO₂ stimule la croissance. (Ariel,2006)

- **pH**

Elevé et alcalin. Le pH optimum pour la croissance de la spiruline est autour de 9,5

- **Le milieu de culture**

Les spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline. De ce fait là elles sont protégées contre germes et parasites.

L'eau utilisé pour le milieu de culture doit être de préférence potable (mais ne sentant pas fortement le chlore) ou au moins filtré, le plus important étant l'élimination des algues étrangères.

La composition des milieux de culture peut varier énormément, selon la disponibilité des produits chimiques nécessaires à leur élaboration.

La salinité sera d'environ 13g/litre avec une concentration en alcali de 0,1 molécule-gramme/litre.

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium, mais ce dernier peut être remplacé en partie par la soude caustique ou du carbonate de sodium qui ont d'ailleurs l'avantage de relever le pH initial du milieu de culture (par exemple : 5g/l de bicarbonate + 1,6g/l de soude donnent un pH de 10).

La salinité complémentaire est apportée par les différents engrais et du **chlorure** de sodium.(milieu va être utilisé un sel non raffiné).

La spiruline a également besoin pour sa croissance des engrais contenant : azote (N), phosphore (P), potassium (K), qui sont les trois principaux éléments, mais soufre (S), magnésium (Mg), calcium(Ca) et fer(Fe) doivent aussi être s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau, le sel et les engrais.

Les sources naturelles d'azote pour la spiruline sont l'ammoniac et l'urée. Le plus souvent est utilisé un nitrate qui n'est pas toxique à forte concentration.

L'eau, le sel et les engrais apportent généralement assez de micro-éléments (bore, zinc, cobalt, molybdène, cuivre, etc.) (Jourdan, 2006)

✓ **Ensemencement**

Pour ensemer, de préférence prendre une semence 100% spiralée, de grandes tailles, d'un beau vert tirant vers le bleu-vert, filtrant facilement. Car, un trop fort pourcentage de droites conduit à des difficultés de récolte, il suffit de transvaser dans un milieu de culture neuf un certain volume de culture provenant d'un autre bassin en production jusqu'à ce que la couleur devienne verte. On enseme de préférence le soir (**Jourdan, 2006**).

✓ **Conduit et entretien de la culture**

- Agitation

Les roues à aubes constituent les systèmes d'agitation les plus utilisés ; le but est de remuer l'eau et non de créer un dénivellement comme on le croit généralement (**Fox, 1999**).

On agite au moins 4 fois par jour, mais la fréquence minimum dépend des conditions et de la souche : elle augmente avec l'intensité de la lumière et de la flottaison. Au milieu d'une journée très chaude, sans ombrage, l'agitation d'une souche spiralée flottant fortement doit être très fréquente (au moins deux fois par heure) ou même continue. (**Jourdan, 2006**).

- Evolution de pH

Un bon test de croissance d'une culture est son augmentation de pH. Une autre façon de vérifier que la photosynthèse est activée et d'observer le dégagement d'oxygène à la surface du bassin en l'absence d'agitation. (**Jourdan, 2006**).

- Ombrage

L'ombrage est important pour des températures basses (ou la spiruline peut mourir par la photolyse). Il faut aussi ombrer le lieu pour économiser l'eau en raison sèche ou si la température s'élève au-dessus de 38°C dans la culture. (**Dupire, 1998**).

- Niveau de l'eau

Veiller à ajouter de l'eau dans le bassin (de préférence le soir) pour maintenir le niveau voulu. Ne pas ajouter plus de 10% du volume du bassin par jour. (**Jourdan, 2006**).

✓ **Récolte et extrusion**

Dans de bonnes conditions il est possible de récolter chaque jour 1/6 à 1/3 de la culture. La culture est filtrée à travers deux dispositifs, en général superposés. Le premier est constitué d'une toile fine (maillage environ 3000 µm de diamètre) qui retient les grumeaux, insectes, larves et feuilles. Le second est un tissu à mailles plus fines (environ 30 µm) qui retiennent la spiruline. (**Charpy et al., 2008**)

La biomasse obtenue est pressée/ essorée. La spiruline fraîche ainsi obtenue peut être consommée directement, ou séchée pour conservation.

✓ **Séchage et conditionnement**

La biomasse va ensuite être répandue en spaghetti sur une grille pour sécher soit au soleil, soit sur un séchoir électrique. **(Dupire, 1998).**

La norme de la teneur en eau de la spiruline sèche est inférieure à 10%. En général la spiruline vouée à la commercialisation contient 7% d'eau.

La spiruline sèche est alors broyée sous forme de poudre ou sous forme de paillettes et conservée dans un récipient étanche à l'abri de l'humidité et de la lumière. La spiruline peut être conditionnée dans des sachets, boîtes ou flacons sous formes de brindilles, de poudre, de gélules et de comprimés.

V.2. Production semi industrielle et industrielle

Les systèmes de production semi industrielle et industrielle se différencient par l'ordre de grandeur de l'investissement, la surface des bassins de culture, le tonnage de production, et la sophistication des techniques de production.

Les fermes semi-industrielles sont des systèmes de production qui peuvent être modulaires et démarrer à partir de petites exploitations de type artisanal. Ces fermes sont constituées de 25 bassins de 200 à 1000 m² avec une surface totale exploitée entre 3000 m² et 1 hectare. Leur capacité de production annuelle est de 10 à 50 tonnes **(Ayala et al., 2006).**

A l'opposé il existe quelques unités de production industrielle de spiruline, que l'on trouve dans le marché mondial. Quelques sept à huit mille tonnes produites en 2006.

Les deux plus importantes unités de production sont implantées l'une aux USA dans le désert de Californie, l'autre en Chine.

Cette production se distingue des précédentes par l'importance des moyens mis en place dont ceux pour les contrôles de qualité, sa capacité de production et son objectif, purement commercial.

Une exploitation industrielle, d'une surface totale de plusieurs hectares, peut produire entre 50 et 500 tonnes de Spiruline sèche par an. Les bassins ont une surface de 1000 à 5000 m². La plupart des productions industrielles utilisent des systèmes informatisés contrôlant automatiquement la production. **(Charpy et al., 2008).**

VI. Les activités thérapeutiques de la spiruline

Parmi les activités thérapeutiques de la spiruline on a :

✚ Renforcement du système immunitaire

Plusieurs expériences attestent que la spiruline régulerait favorablement le système immunitaire, elle augmente le système d'activation des macrophages, l'activation des cellules T et l'activité des cellules NK. Ce processus permet la libération d'interféron gamma (IFN- γ) ce qui peut finalement rendre les virus inactifs. Ces actions se font par le biais des Polysaccharides(Iwata *et al.*,1990).

✚ Effets contre la toxicité des reins

D'après Yamane *et al.* (1988), les rats ayant une forte teneur en mercure montrent des urines riches en azote et un sérum riche en créatine, indicateurs d'une infection des reins. L'ajout de 30% de spiruline dans le régime alimentaire fait diminuer les taux de ces indicateurs, par l'intermédiaire de la diminution de l'activité de certaines enzymes (alcaline phosphatase et glutamic-oxalo-acétate transaminase). Il est suggéré que la phycocyanine serait responsable de cette diminution d'activité et de la détoxification des reins.

✚ La spiruline en tant que complément alimentaire

De sa richesse micronutrient, acides aminés, vitamines, antioxydant, minéraux, la spiruline pourrait être d'un grand intérêt dans la récupération nutritionnelle des enfants malnutris. Un essai de (Sall *et al.*, 1999) a montré qu'il s'agit d'un produit accepté, bien toléré et qui assure une prise pondérale satisfaisante et une normalisation des marqueurs biochimiques. Aussi, les qualités nutritionnelles de la spiruline la rendent très intéressante dans la lutte contre la malnutrition.

La spiruline peut être un complément minéral et vitaminique susceptible d'être utilisé dans les préparations alimentaires des enfants(Charpy *et al.*,2008).

I. Définition

Les bifidobactéries appartiennent à la famille des bactéries lactiques. Elles participent à la fermentation du lait, de plus, elles produisent de grandes quantités d'acide lactique, ce qui entraîne une baisse du pH qui est favorable et qui inhiberait la croissance d'autres germes.

Ces bactéries ont la particularité de coloniser l'intestin. Leurs présences durables favoriseraient donc une bonne santé intestinale et le renforcement du système immunitaire (Ballonge,1993)

II. Caractères généraux

Les Bifidobacteries sont des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes, immobiles, non sporulantes, elles sont hétéro-fermentaires, avec un pourcentage de bases GC compris entre 55 et 67%, et dont les compositions en peptidoglycanes sont très variables (Ballonge, 1993).

Leur pH optimum de croissance est compris entre 6,5 et 7 mais elles ne croient pas à pH 4,5 - 5,0 ni à pH 8,0 – 8,5 (Scardovi, 1986).

Les Bifidobactéries ont une grande variété de forme : coccoïde, allongée avec des protubérances et des bifurcations, en culture fraîche.Elles adoptent souvent une morphologie caractéristique en forme de Y. (Figure n°02)

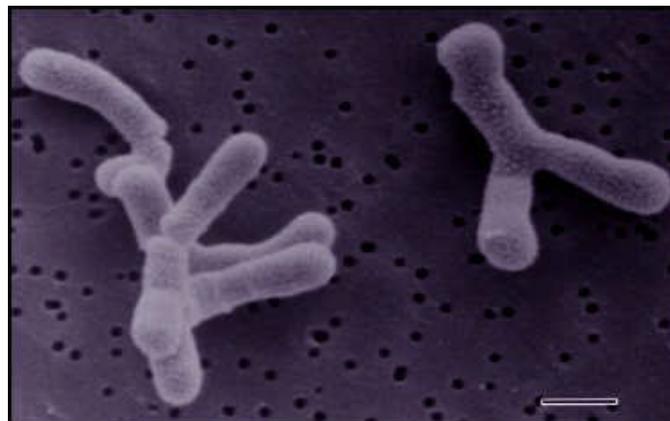


Figure n° 02 : Aspect microscopique de *Bifidobacterium adolescentis* Grossissement (Leveau et Buix,1993)

II.1 Classification

La classification de Bifidobacteries est comme suit(Mitsuka,1984) :

- + Règne : *Bacteria*
- + Embranchement : *Actinobacteria*
- + Classe : *Actinobacteria*
- + Sous-classe : *Actinobacteridae*
- + Ordre : *Bifidobacteriales*
- + Famille : *Bifidobacteriaceae*
- + Genre : *Bifidobacterium*
- + Espèce : *Bifidobacterium infantis* , *Bifidobacterium longum*....

III. Métabolisme

Toutes les espèces de bifidobacteries sont nitrate- réductase- négative. On trouve dans la majorité des espèces des souches possédant une activité urease. L'ammoniaque est généralement utilisé comme source d'azote par toutes les espèces (Scardovi,1986).

Les résultats obtenus par Sakata et al.(2002) et portant sur 25 souches de *Bifidobacterium longum* (12 souches de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* , 11 souches *Bifidobacterium longum* et 2 souches *Bifidobacterium subsp. Suis*) sont présentés ci-dessous :

- ✓ Toutes les souches fermentent le fructose, le glucose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le ribose, le raffinose et le saccharose.
- ✓ Aucune souche ne fermente l'amygdaline, glycerol. le cellobiose et le glycerol.
- ✓ Toutes les souches du *Bf. biovars infantis* fermentent le ribose mais aucune souche ne fermente le L-arabinose.
- ✓ Toutes les souches du *Bf. biovars infantis* fermentent le L-arabinose,
- ✓ Toutes les souches du *Bf. biovars longum* fermentent le L-arabinose, le ribose et le D-xylose ; aucune des deux souches ne fermente le L-arabinose.
- ✓ Toutes les souches du *Bf. biovars longum* fermentent le L-arabinose, le ribose et le D-xylose. Aucune souche ne fermente l'amidon, l'esculine, l'inuline, le mannitol, la salicine et le tréhalose.

Les deux souches du *Bf.bio* var fermentent le L-arabinose, le mannose et le D-xylose. Aucune des deux souches ne fermente l'amidon, la dextrine, l'esculine, l'inositol, l'inuline, le mannitol, le mélézitose, le ribose, le sorbitol, la salicine. (Sakata et al.,2002)

IV. Colonisation microbienne du tube digestif des nourrissons

Durant la vie intra utérine, le fœtus se développe dans un environnement stérile (Romond et Romond, 1994)

A la naissance, on assiste à la colonisation bactérienne du tube digestif. Cette flore atteinte au bout de 48 heures un taux compris entre 10^9 et 10^{11} germes par gramme de selles, c'est-à-dire un taux voisin de ce qu'on trouve chez l'adulte (Bourlioux ,1994)

Cette population microbienne est fortement influencée par le mode d'allaitement (Petschow et Talbott, 1991)

V. Les probiotiques

Selon Descheemaeker (2000), Les probiotiques ou agents biothérapeutiques sont des micro-organismes vivants (microbes, levures), administrés sous forme soit alimentaire (choucroutes, yaourt, lait fermenté) soit lyophilisée, et qui exercent un effet bénéfique sur notre santé, en rétablissant un meilleur équilibre au niveau de notre flore intestinale.

Les principales souches connues en tant que probiotiques chez l'humain sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Entèrococcus*, *Stréptococcus* et des levures du genre *Saccharomyces*. Les espèces associées à chacun de ces groupes sont représentées au **tableau 5 (Annexes)**

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit présenter les caractéristiques suivantes : (Tannock,1995 ; Salminen et Isolauri, 1996 ; Stanton et al.,2001).

- ✓ Etre un habitat naturel de l'intestin.
- ✓ Etre capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier.
- ✓ Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduit l'adhérence des pathogènes.
- ✓ Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H_2O_2 , bactériocines...).
- ✓ Non invasif, non cancérigène et non pathogène.
- ✓ Etre capable de co-gréger pour former une flore normale équilibrée.

- ✓ Survivre aux différents procédés technologiques de production.

V.1. Le mécanisme d'action

❖ Compétition spécifique et non spécifique

Les deux premiers mécanismes possibles pour l'action des probiotiques concernant leur capacité à adhérer à la muqueuse intestinale. Etant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte certaines bifidobactéries et lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003 ; Servin et Coconnier, 2003 ; Servin, 2004 ; Picard *et al.*, 2005).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003).

Le deuxième mécanisme d'action des probiotique concerne l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à des composés antimicrobiens. Les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* d'origine humaine peuvent produire des substances antimicrobiennes, telles que les acides organiques, qui sont actives *in vitro* et *in vivo* contre les micro-organismes entérovirulents impliqués dans les cas de diarrhées (Servin, 2004). L'acide lactique et acétique sont produits via la fermentation des hexoses par les Lactobacilles et Bifidobactéries. Ces acides organiques peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles (Deng *et al.*, 1999).

Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002 ; Servin, 2004).

❖ Compétition au niveau d'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des pathogène peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de Bifidobacteries ou de Lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de

diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de microorganisme pathogènes(**Fooks et Gibson, 2002**).

❖ **Stimulation de mécanisme de défense immunitaire**

Le dernier mécanisme porte sur l'interaction des probiotiques avec le système immunitaire pour accroître la réponse immunitaire de l'hôte contre des entéropathogènes. Parmi les effets observés, quelques auteurs soulignent une stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophage, basophiles, monocytes) par les probiotiques(**Fooks et Gibson,2002 ; Gill, 2003 ; Servin, 2004**)

V.2. Les principaux effets bénéfiques de probiotiques

Un certain nombre d'effets sur la santé sont associés à l'utilisation du probiotique parmi eux : (**Mercenier et al., 2003 ; Parvez et al.,2006**)

- Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire (par exemple : protéine, polysaccharide).
- Aides à la digestion du lactose par l'activité de β -galactosidase bactérienne.
- Stabilisation et équilibre de la microflore intestinale
- Réduction (de risque) de troubles intestinaux (infection gastro-intestinales, constipation).
- Réduction du risque et durée de la diarrhée (à rotavirus, diarrhée infectieuses, associé aux antibiotiques, liés au *Clostridium difficile*, diarrhées de voyageur).
- Baisse du taux de cholestérol dans le sang.

- Inhibition des bactéries indésirables et pathogènes(infectiongastro-intestinale ; *Helicobacterpylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhymurium*, *Clostridium difficile*, infections de l'étendue urinaire ; infection de l'étendue respiratoire) .

VI. Les prébiotiques

VI.1 Définition

Un prébiotique est défini comme « un ingrédient alimentaire non digestible qui produit un effet bénéfique chez l'hôte en stimulant de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou plusieurs espèce(s) bactérienne(s) dans le côlon (**Gibson et Roberfroid, 1995 ; Roberfroid, 2001**).

Comparés aux probiotiques qui introduisent des bactéries exogènes, les prébiotiques modulent les bactéries endogènes, c'est-à-dire la composition de l'écosystème naturel, en privilégiant les microorganismes exerçant un effet positif (Bifidobactéries et Lactobacille) (**Robertfroid, 2001**)

Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit (**Gibson et Roberfroid, 1995**).

- ✓ Etre ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal.
- ✓ Etre sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes.
- ✓ Modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition.
- ✓ Induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte.

VI.2. Le symbiotique

Un symbiotique est un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées sous forme de suppléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal, et par conséquent, la santé et le bien-être de l'hôte (**Chouraqui, 2002**).

Notre travail expérimental s'est effectué durant une période de 07 mois, nous l'avons réalisé en trois étapes, la première durant laquelle nous avons réalisé les différentes analyses bactériologiques et physicochimiques de notre lait infantile < Célia 1^{er} âge >, Identification de la souche bifide, Caractérisation de la souche bifide dans deux milieux de culture (lait seul, lait enrichi en spiruline locale (région de Tamanrasset), Suivre la cinétique de croissance et le pouvoir acidifiant des bifidobacteries, a eu lieu au laboratoire d'analytique et microbiologique du centre de recherche et de développements de Saidal el Harrache.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Souches bifides

Les souches de *Bifidobacterium* ont été isolées à partir des selles de nourrissons sous allaitement maternel exclusif A l'hôpital de Frantz- Fanon Blida.

I.1.2. Souche spiruline

La spiruline a été récoltée et séchée dans la région de Tamanrasset.

I.1.3. Le lait infantile

Il s'agit de lait infantile 1^{ère} âge sous la dénomination «Célia 1^{er}âge ».

I.1.4. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture sont proposés pour isoler les bifidobactéries. Nous avons cependant retenu le milieu Man Rogosa et Sharp (MRS) et gélose nutritive.

II. Méthodes

II.1. Enquête sur les différents types d'allaitement

- **Objectif de l'étude**

L'objectif de cette étude est de présenter les différents types d'allaitement adoptés par les mamans (naturel, artificiel, mixte) selon ; la marque, le prix, disponibilité et valeur nutritive. Ainsi que ses effets (constipation, colique, diarrhées, problèmes digestifs....).

- **Déroulement de l'enquête**

L'enquête a été réalisée au niveau de l'hôpital Hassiba Ben Bouali dans le service pédiatrie pendant un mois sur tous les nourrissons hospitalisés ou qui sont venus en consultation externe (contrôle de croissance, conseils diététiques, prise en charge des cas de pathologies courantes) et qui sont sous allaitement maternel exclusif, sous allaitement artificiel et sous allaitement mixte.

La population ciblée est constituée des enfants âgés de 0 à 7 mois sur 60 enfants. Un questionnaire a été élaboré pour collecter les informations générales relatives aux nourrissons

(âge, sexe, poids, type d'accouchement, antibiothérapie, type d'allaitement,.. etc.) (Annexes 01).

II.2. Isolement de bifidobactéries à partir des selles de nourrissons

- **Échantillonnage**

Les bifidobactéries proviennent des selles fraîches des nourrissons (diarrhéique ou non), allaité exclusivement au sein (allaitement naturelle).

L'échantillonnage est effectué au niveau de l'hôpital pédiatrique de Hassiba Ben Bouali Blida, Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable.

- **Mode opératoire**

1 g de selle est mélangé avec 9 ml de d'eau physiologique sous la hotte (dans un environnement stérile). Le mélange qui est appelé solution mère est ensuite mis dans un tube à essai hermétiquement fermé, il s'agit de la dilution 10^{-1} , Incubation à 37 °C pendant 18h.

On prépare 7 dilutions dans 7 tubes différents de façon à prendre 1 ml de solution à partir de la solution pré-enrichie et ainsi de suite. Chaque tube contient préalablement 9 ml d'eau physiologique. On obtient donc 7 tubes 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} de dilutions.

On prélève 1 ml, à l'aide de pipettes, de chaque tube des trois derniers dilutions : 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} et on les ensemence aseptiquement dans 3 boîtes de pétri stériles (ensemencement en profondeur). On réalise 2 essais pour chaque échantillon afin d'avoir des résultats avec précision (Figure n°03)

On chauffe la gélose MRS dans un bain Mari afin qu'elle devient liquide à couler dans les boîtes de Pétri (gélose en surfusion à 45°C). On effectue un mouvement de « 8 » pour homogénéiser le milieu et la dilution. Une fois la gélose se solidifie, on les met à l'étuve à 37°C pendant 48h.

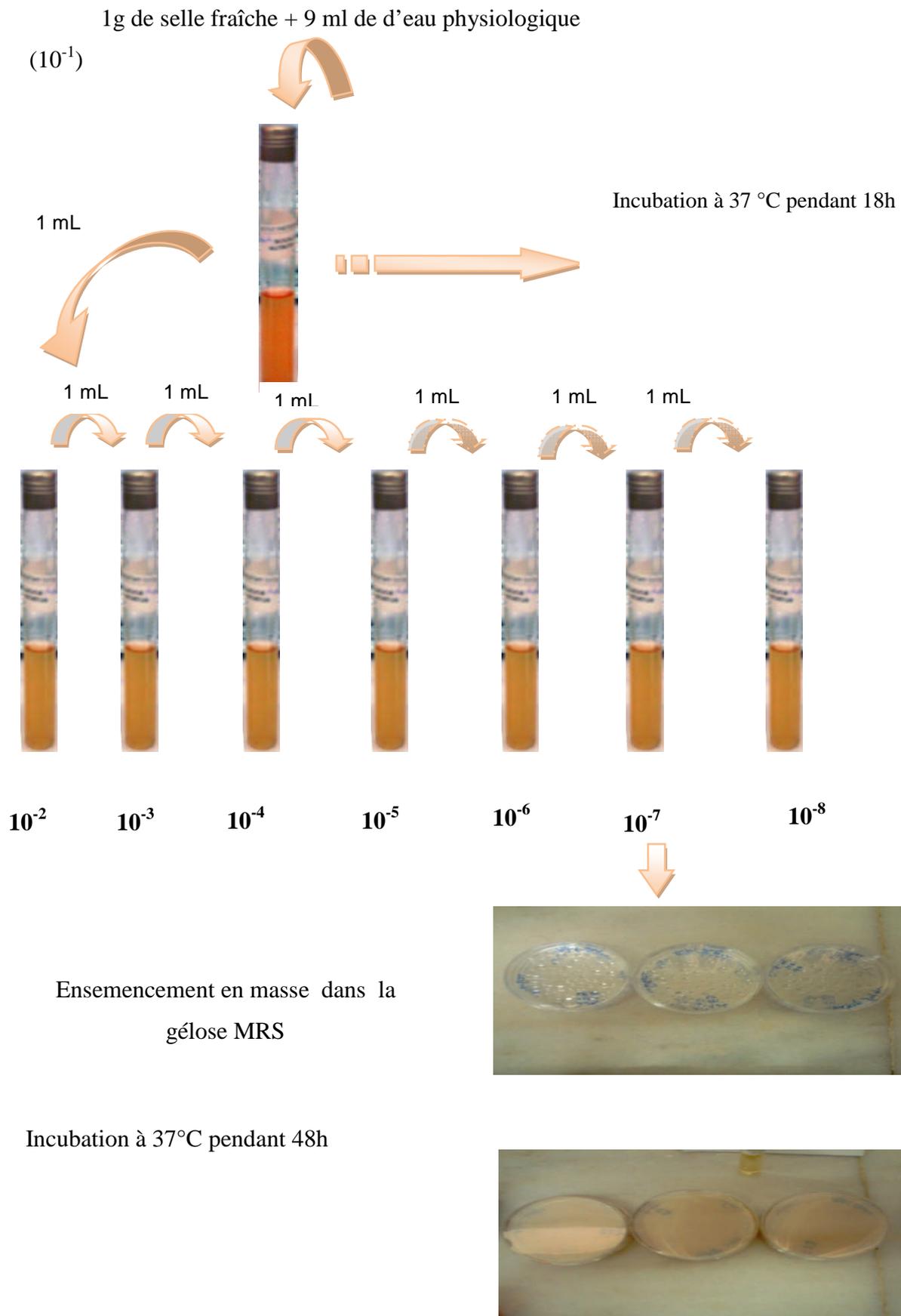


Figure n°03 : Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir des selles de nourrisson.

II.3. Contrôle de pureté de la souche bifidobactéries

Les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS, Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C. Après quoi les souches seront repiquées sur MRS à pH 6,4. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide.

II.3.1. Identification biochimique de la souche bifide

a. Test de la catalase

Une colonie d'une culture de moins de 24 heures de chaque isolat a été déposée via une anse sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène a ensuite été ajoutée. La présence de catalase se traduit par l'apparition d'une effervescence. Les isolats ne possédant pas de catalase sont incapables de dégrader le peroxyde d'hydrogène. Ils sont catalase négatifs caractéristique des bifidobactéries.

b. Coloration de Gram

Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame. Des solutions de cristal violet et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis pendant 1 min, suivi d'un lavage à l'eau. De l'éthanol à 90% a été appliqué sur le frottis, qui ensuite a été traité avec de la fuschine pendant 30 secondes. Le frottis a été observé au microscope photonique sous immersion au grossissement 100 X. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (-).

c. Pour confirmer la pureté de la souche étudiée, nous procédons au test biochimique de la galerie API 20E (figure n°04)

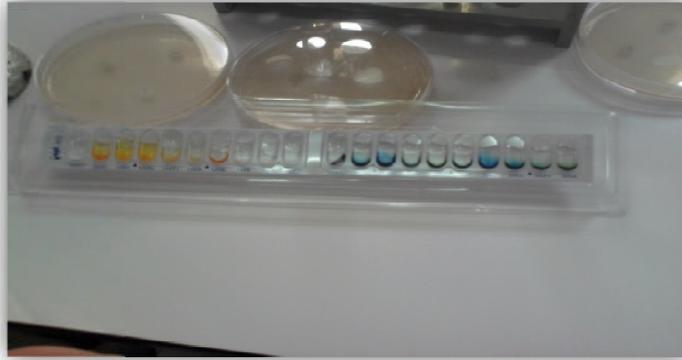


Figure n° 04: Identification biochimique de la souche *Bifidobacterium infantis* par galerie API 20E.

II.3.2. Conservation de la souche bifide

Une seule colonie est récupérée et ensemencée sur milieu Columbia, 48 heures plus tard, après vérification de l'appartenance au genre *Bifidobacterium* par coloration de Gram et test de catalase, on prend à nouveau une colonie et on l'ensemence dans un tube de 9ml de bouillon MRS, après 24 heures d'incubation la souche sera congelée et conservée au congélateur à - 18°C.

II.4. Contrôle bactériologique et physicochimique du lait infantile

Le lait infantile 1^{ère} âge est soumis à des contrôles de qualité physico-chimique et microbiologique.

➤ Les analyses physico-chimiques

Le matériel destiné aux examens physico-chimique doit être propre, sec et ne doit pas avoir d'influence sur les propriétés du produit, telles que la saveur, la consistance, ou la composition du produit.

➤ Les analyses microbiologiques

En vue d'analyses microbiologiques, le matériel doit être parfaitement propre, stérile sec au moment de son utilisation. Le prélèvement doit se faire de manière aseptique et le récipient pour échantillon doit être fermé immédiatement après échantillonnage (norme internationale ISO 9001).

II.4.1. Analyses physicochimique de l'échantillon

1. Détermination de l'extrait sec total (EST) (NF T90-029)

La matière sèche de lait est la masse exprimée en pourcentage pondéral. Elle est exprimée par la masse en gramme de la matière sèche du lait.

- **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur l'évaluation de l'eau dans une quantité de lait.

- **Mode opératoire**

Le dessiccateur étant en marche, on mesure la masse de la capsule vide, on étale ensuite 2 gr de l'échantillon sur la capsule puis on l'introduit dans le dessiccateur, on fixe la température à 102°C.

- **Expression de résultat**

Quand la dessiccation est complète, l'appareil s'arrête automatiquement et affiche la valeur de l'extrait sec total.

Taux d'humidité :

$$H\% = 100 - EST$$

2. Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH) (NF T01-013)

Le pH ou potentiel d'hydrogène est proportionnel à la concentration des protons (H^+) dans la solution.

$$[H^+] = 10^{-pH}$$

3. Mesure de l'acidité titrable

L'acidité titrable correspond à la teneur en acide lactique du lait. Elle est conventionnellement exprimée en gramme d'acide lactique (AFNOR, 1986).

- **Principe**

Le lait contient de l'acide lactique qui est titré par la soude (NaOH) en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine).

La réaction chimique est suivante :



4. Détermination de la teneur en matière grasse (AFNOR, 1986)

La méthode accido-butyrométrique (**méthode de Gerber**) est une technique conventionnelle permettant d'évaluer la teneur en matière grasse des produits laitiers, elle est basée sur la dissolution des protéines par addition d'acide sulfurique et d'alcool iso amylique pour la séparation de la matière grasse (**MG**).

- **Mode opératoire**

- ✓ Introduire 10 ml d'acide sulfurique « d=1,1986 » dans le butyromètre.
- ✓ Additionner 11ml de l'échantillon.
- ✓ Ajouter 1ml d'alcool iso amylique.
- ✓ Fermer le butyromètre par un bouchon propre et sec.
- ✓ Tenir le butyromètre avec un chiffon et retourner le 3 à 4 fois en agitant jusqu'à dissolution des éléments de l'échantillon.
- ✓ Mettre le butyromètre dans la centrifugation en équilibre avec un autre butyromètre contenant de l'eau.

II.4.2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons de lait infantile 1^{er} âge visaient à contrôler la qualité hygiénique de ces produits. Nous avons réalisé ces analyses dans le laboratoire de microbiologie aCRD <Saidal>.

1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Le lait infantile destinés aux analyses microbiologiques dans notre étude est un produit solides donc pas directement pipetables, de ce fait, ils nécessitent une fluidisation représentée par ce qu'on appelle: la suspension mère. Cette suspension doit être préparée dans des conditions d'asepsie rigoureuse en manipulant sous hotte. On a procédé à leurs préparations selon la norme ISO 9001.

On introduit aseptiquement 25g dans un récipient stérile et taré ; ajouté ensuite 225ml d'eau physiologique ou TSE puis homogénéisé, cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond aussi à la dilution 1/10 ou 10^{-1} .

On introduit ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la DM dans un tube stérile contenant au préalable 9ml d'eau physiologique. Cette dilution constitue la 1/100 ou 10^{-2} . On procède de la même manière pour les autres dilutions.

❖ **Recherche et dénombrement de la flore microbienne**

Le choix des espèces microbiennes à rechercher dans nos produits : lait infantile a été effectué conformément aux normes Algériennes.

En effet, les analyses microbiologiques reposent sur la recherche et le dénombrement des germes les plus significatifs de l'état hygiénique du produit, nous avons effectué :

- La recherche et le dénombrement des germes totaux qui est un indice de l'état général de la qualité du produit ;
- La recherche et le dénombrement des groupes de germes indicateurs de contamination fécale : les coliformes et les *Clostridium*sulfito-réducteurs ;
- La recherche des germes pathogènes : Les salmonelles et le *Staphylococcus aureus* ;

1. Recherche et dénombrement des germes aérobies à 30 °C

• **Principe**

Les microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs se développent dans un milieu nutritif de gélose non sélective (**PCA**) à 37°C pendant 48 heures. Après incubation ils apparaissent sous forme de colonies lenticulaires (**Giraud, 2003**).

• **Technique**

On introduit aseptiquement 1ml de chaque dilution ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$) dans des boîtes de Petrie stériles et on coule la gélose (**PCA**) en surfusion à 45°C. On agite les boîtes manuellement en faisant des mouvements circulaires pour mélanger l'inoculum et la gélose. Après refroidissement on incube à 37°C pendant 48h.

• **Lecture**

Il s'agit de compter les colonies qui sont sous formes lenticulaire en masse jaunes ou blanchâtres en tenant de :

Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, en multipliant le nombre de germes trouvés par l'inverse de sa dilution. Faire la moyenne des colonies entre les différentes dilutions.

2. Recherches et dénombrement des coliformes (totaux et fécaux)

• **Principe**

Les coliformes fermentent rapidement le lactose à 32°C pendant 24 à 48 heures avec le dégagement de gaz. Pour cela on utilise des milieux de culture contenant le lactose comme source de carbone et d'énergie.

Pour notre étude nous avons utilisé le VRBL.

- **Technique**

A partir des dilutions décimales ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$), on porte aseptiquement 1ml avec une pipette Pasteur de chaque dilution dans une boîte de Pétri préparée à cet usage. Cette opération doit être effectuée en double pour chaque dilution car :

- ✓ La première série de boîte incubée à 37°C, et sera réservée à la recherche des coliformes totaux.
- ✓ La deuxième série de boîte sera incubée à 44°C, et sera réservée à la recherche des coliformes fécaux (E.coli)
 - On complète ensuite les boîtes environ 20 ml de gélose VRBL puis on refroidit à 45°C.
 - On fait ensuite des mouvements circulaires en forme de 8 pour bien mélanger la gélose à l'inoculum.
 - On laisse solidifier les boîtes sur la paille, puis on l'incube pendant 24 à 48 heures à :
 - 37°C pour la première série de boîtes (recherche de C. totaux)
 - 44°C pour la deuxième série de boîtes (recherche de C. fécaux)

- **Lecture**

Les coliformes (totaux et fécaux) apparaissent en masse sous forme de petites colonies de couleur rouge et foncé et de 0.5 mm de diamètre, fluorescentes. Le nombre de colonies sera multiplié par l'inverse de la dilution correspondant.

3. Recherches et dénombrement de *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré)

- **Principe**

L'enrichissement sur Giolitti Cantonii (GC) additionné de tellurite de potassium ; agent sélectif et indicateur de réduction et basé sur le principe de l'inhibition par le tellurite de potassium et le chlorure de lithium.

- **Technique**

Préparation du milieu d'enrichissement :

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu Giolitti Cantonii puis ajouter 15ml de la solution Tellurite de potassium, Bien mélanger, le milieu pris l'emploi.

- **Ensemencement**

A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1ml par dilution un tube à vis stérile

- Ajouter par la suite environ 15ml du milieu d'enrichissement
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

- **Incubation**

Incuber à 37°C pendant 24 à 48h.

- **Lecture**

Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman.

Les boîtes de Chapman ainsi ensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48h, après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisse, brillante, convexes et entourées d'un halo noir d'environ 1 à 5 mm de diamètre due à une lipolyse et protéolyse du jaune d'œuf. Les résultats s'expriment par (germe/ml).

4. Recherche et dénombrement de *Salmonella*

- **Principe**

La mise en évidence de la contamination d'un produit par salmonelle se fait en 03 étapes :

- Pré-enrichissement (24 heures)
- Enrichissement en milieu liquide (SFB) pendant 24 heures à 37°C
- Isolement sur milieu sélectif solide (gélose **Héktoene**) pendant 24h à 37°C

- **Technique**

- Pré-enrichissement

A partir de la dilution mère, prélever 25ml et introduire dans un tube à essai contenant 100 ml du milieu BLMT (bouillon lactose mannitol tamponné). Cette étape permet la récupération des bactéries stressées (**Bourgeois et al., 1990**)

- Enrichissement

Il s'effectue en prenant 1ml du milieu de pré-enrichissement, qu'on introduit dans 10 ml de milieu SFB. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

- Isolement

Il se réalise sous forme de stries sur milieu sélectif solide à partir du milieu liquide d'enrichissement. Le milieu utilisé pour l'isolement des salmonelles est la gélose **Héktoéne** qui contient essentiellement des agents sélectifs comme les sels biliaires, des sucres notamment le lactose.

- **Identification et lecture**

Les colonies caractéristiques des salmonelles sont lactose négatif, H₂S positive, bleu versâtes, avec ou sans centre noir (Bourgeois et al.,1990 ; Guiraud, 2003).

5. Recherche et dénombrement des *Clostridium* Sulfito-réducteurs

- **Principe**

Le milieu utilisé est la gélose viande-fois (VF) additionnée de sulfite de sodium et d'alun de fer. L'action des *Clostridium* sulfito-réducteurs conduit à la réduction de sulfite de sodium en présence d'alun de fer en sulfure de fer, donnant des colonies noires.

- **Technique**

On prend 3 tubes à essai, deux tubes à essai contenant 5ml de solution mère et le troisième contenant 1ml de la solution mère plus 4ml d'eau physiologique, sont portés au bain Marie à 80°C pendant 10 mn afin de tuer les cellules végétatives et d'activer les formes sporulées.

Les tubes sont aussitôt refroidis à l'eau du robinet avant de faire couler stérilement la gélose viande foie, additionnée de sulfite de sodium (5ml) et d'alun de fer (2ml).

L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 72 heures.

- **Lecture**

Les colonies de *Clostridium* sulfito-réducteurs apparaissent entourées d'un halo noir caractéristique. Chaque colonie noire est issue de la germination d'une spore, d'où l'expression du résultat en nombre de spore par gramme ou millilitre du produit (spore/mg ou spore/ml).

6- Recherche et dénombrement des levures et moisissures

- **Principe**

Le milieu utilisé doit inhiber la croissance de toutes les bactéries. Il doit renfermer donc une substance inhibitrice de leur développement (antibiotique) la substance choisie est donc l'oxytetracycline pour OGA et la chloramphénicol pour Sabouraud (SBA) (Guiraud, 2003).

- **Mode opératoire**

A partir de la dilution décimale 10^{-1} , ensemencer aseptiquement 0.1ml dans une boîte de pétrie contenant de la gélose Sabouraud, étaler cette suspension à l'aide d'un râtaustérile, puis incubé à 25°C pendant 3 à 5 jours.

- **Lecture**

Les colonies de levure ressemblent à celle des bactéries mais plus grandes. Elles sont brillantes, rondes, bombées et de couleurs différentes, alors que celles des moisissures ont un aspect velouté, de couleur blanche ou pigmenté de tailles plus grandes que les précédentes. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par ml ou gramme de produit.

II.5. Suivi de l'acidification et de la croissance de *Bifidobacterium infantis* dans le lait écrémé reconstitué seul et dans le lait additionné de spiruline

II.5.1. La reconstitution du lait infantile adapté 1^{er} âge

La préparation du lait adapté premier âge a été faite par mesure d'une quantité adéquate de la poudre de lait. Celle-ci a été reconstituée dans l'eau osmosé stérile à raison de 33,67g (7cuillère) dans 210 ml d'eau (reconstitution indiquée sur l'emballage).

Une fois la poudre dissoute dans l'eau, le lait est réparti dans des tubes à essais à raison de 9 ml. Le lait est stérilisé à l'autoclave à 110°C. Pendant 10 minutes. Le lait est conservé au congélateur à -20°C. Jusqu'au moment de son utilisation. (Figure n°05)



Figure n° 05 : La reconstitution de lait adapté 1^{er} âge

Nous avons préparé, une série de tubes, chaque tube contient 9 ml de lait écrémé reconstitué, et d'autre série dont les tubes contiennent 9ml de lait écrémé reconstitué additionné de 1% de spiruline.

Le lait reconstitué seul et enrichi avec la spiruline et pasteurisé à 110°C pendant 10mn est réalisée dont le but d'éliminer tous les germes pathogènes et indésirables. Après refroidissement à 45°C nous avonsensemencé les deux séries de tubes avec 1ml de la culture pré-enrichi de *Bifidobacterium*.

L'incubation est effectuée à 37°C et en aérobiose pendant 24h, Pour chaque temps (T₀, T₂, T₄, T₆, T₈, T₂₄), nous avons suivi l'évolution du pH et de la flore *bifidobacterium* dans le lait seul et dans le lait additionné de **1%** spiruline. **(Figure n°06)**

❖ **Dénombrement de *Bifidobacterium* sur gélose MRS :**

- ✓ Préparer 6 boîtes de Pétri stériles, pour chaque dilution (10^{-6} , 10^{-7} , et 10^{-8}) dans 2 boîtes de Pétri 1 ml de chaque dilution est ensemencé en profondeur sur gélose MRS, fondu et refroidi à 45°C, bien homogénéiser le milieu et l'inoculum (mouvement de 8).
- ✓ Après solidification du milieu, ajouter une deuxième couche du milieu MRS (double masse) pour créer l'anaérobiose.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 02 jours.

❖ **Technique du dénombrement**

- Examiner les boîtes, et choisir celles contenant entre 15 et 300 colonies
Compter avec soin les colonies en marquant au fur et à mesure, à l'aide d'un marqueur, sur le fond extérieur de la boîte.
- ✓ Interpréter les résultats en faisant par exemple la moyenne des résultats obtenus pour les deux boîtes de la même dilution (**Joffin et Joffin, 2000**).

II.6. Étude de la résistance de *Bifidobacterium infantis* aux antibiotiques

➤ **Principe**

Cette méthode a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques. La détermination de cette valeur est peu précise, mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet.

➤ **Mode opératoire**

- Prélever une colonie bactérienne puis mélanger dans un tube de 9 ml d'eau distillée stérile
- Mettre le tube à l'étuve à 37°C / 30 min
- Verser le contenu du tube sur la gélose nutritive préalablement fondue dans une boîte de Pétri
- Retourner la boîte de Pétri pour verser l'excès du liquide
- Placer la boîte de Pétri à l'étuve pendant 15 à 30 min pour sécher le film liquide resté à la surface de la gélose
- Retirer la boîte puis fixer les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose
- Replacer la boîte de Pétri à l'étuve

➤ **Expression des résultats**

Après incubation des boîtes de Pétri, les puits s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

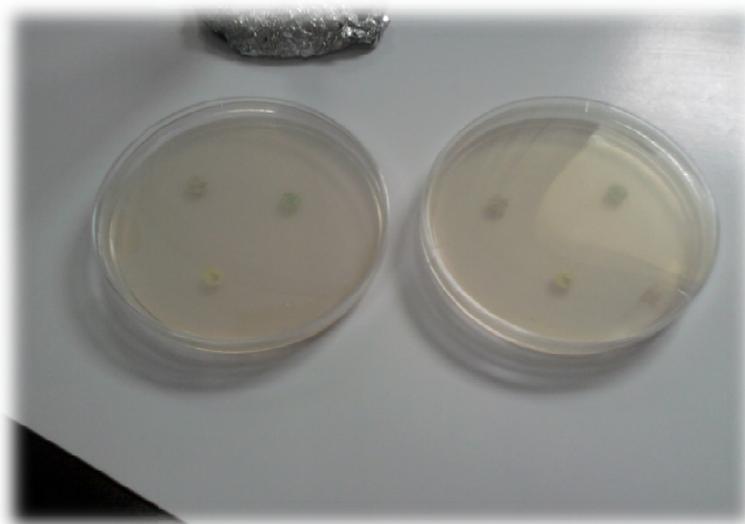


Figure n° 07:Activité inhibitrice d'antibiotique sur la souche *Bifidobacterium infantis*

II.6.1.Détermination des catégories S/I/R

Les trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : **Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I)**

Catégories	CMI (MG/L)	Diamètre (mm)
Sensibilité	$CMI \leq c$	Diamètre $\geq D$
Résistant	$CMI > C$	Diamètre $< d$
Intermédiaire	$c < CMI \leq C$	Diamètre $< D$

c : concentration critique basse

C :concentration critique haute

d :diamètre critique inférieur

D : diamètre critique supérieur

Tableau06: Les différents antibiotiques utilisés

Code	Antibiotiques	Résultats		
		Résistance	Intermédiaire	Sensibilité
AMC	Ampicilline	≤ 13	14 – 16	≥ 17
STR	Streptomycine	6	7 – 9	≥ 10
C	Chloramphénicol	≤ 12	13-17	≥ 18
CL	Colistin	≤ 10	-	≥ 11
SXT	Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	≤ 10	11-15	≥ 16
OX	Oxacilline	≤ 10	11-12	≥ 13

II.7. Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ)

L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre des UFC/ml).

L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres (**Zourari et Desmazeaud, 1991**)

- **V_m**: vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/h
- **T_m**: temps où intervient V_m (en h).
- **pH_i**: pH initial.
- **pH_f**: pH final. $= \Delta / \Delta$

La mesure de la croissance par dénombrement (UFC/ml) permet de calculer le temps de génération (G) ainsi que le taux de croissance (μ) (**Prescott, 1995**).

$$= \frac{\dots}{(\dots)}. \quad \mu = \dots / \dots. \quad = \dots \times 100$$

T : temps.

Log N_f : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T_f).

Log N_i : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T_i).

TA : taux d'accroissement.

I. Résultats

I.1. Résultats d'Enquête sur les différents types d'allaitement

Notre enquête est déroulée dans le service de Pédiatrie de l'hôpital universitaire de Hassiba Ben Bouali de Blida. elle se repose sur les différents types d'allaitement, où on a questionné environ 60 mamans, dont 40 accouchements à voie basse et 20 accouchements par césariennes, ont été exposées aux antibiotiques (Pénicilline, Cephalosporines, Amoxicilline, Ampicilline) pendant l'allaitement et après l'accouchement.

D'après les résultats obtenus, on a pu remarquer que : 50% des mamans optées pour d'allaitement naturel, 30% ont optées pour l'allaitement artificiel et 20% pour l'allaitement mixte. (Figure n°08)

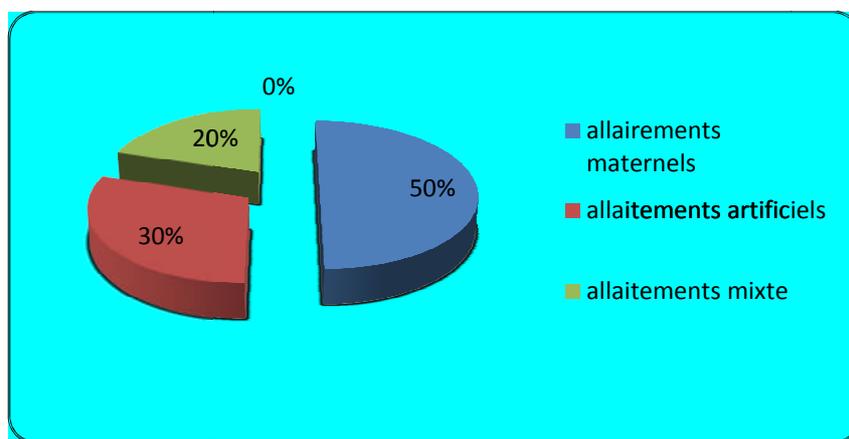


Figure n° 08: Présentations de différents types d'allaitement.

La plus part des mamans qui adoptent l'allaitement artificiel préfèrent le lait « Célia » à cause de sa disponibilité sur le marché et de sa valeur nutritive que grâce au progrès réalisés par les laboratoires pharmaceutiques, la composition des laits artificiels actuels est très proche de celle du lait maternelle mais qui ne peut jamais le remplacer.

I.2. Contrôle de la qualité physicochimique de lait infantile

Les résultats de la caractérisation de certains paramètres physicochimiques de lait infantile 1^{er} âge sont résumés dans le tableau 07

Tableau 07 : Les résultats d'analyses physicochimique

	Lait adapté 1 ^{er} âge	Normes
L'extrait sec total (EST) (%)	96.45	95-97
Humidité (%)	3.55	3-5
Acidité titrable (D°)	13	12-14
Matière grasse (%)	3	0.3 – 4
pH	6.87	6,8 – 6,9

D'après ces résultats :

Nous remarquons que le lait infantile 1^{er} âge présente :

Un **l'extrait sec total** est de 96.45 % ; elle est incluse dans l'intervalle exigé par les normes algériennes. Et un taux d'humidité est de l'ordre de **3.55 %**, concernant **l'acidité titrable et de 13D°**.

Le taux de la matière grasse : Le lait infantile est de bonne qualité avec un taux de matière lipidique faible de l'ordre de 3% qui est conforme aux normes de *Journal Officiel de la République Algérienne* (JORA. 1998) ce qui confirme que la poudre à une reconstitution parfaite, sans risque de formation de grumeau insoluble ainsi qu'un bon respect de conditionnement et de stockage durant toute la période de conservation

Un **pH** de $6,87 \pm 0,01$, qui est conforme à celui recommandé par les normes françaises qui se limite entre 6,8 et 6,9. Le pH bas de lait infantile peut être attribué à la forte concentration en acide gras volatils.

I.3. Contrôle de la qualité bactériologie de lait infantile

Comme le lait infantile seul ou enrichie avec la spiruline et utilisée comme milieu de culture permettant la croissance de l'espèce *Bifidobacterium infantis*, nous avons procédé au contrôle de la qualité bactériologique du lait infantile.

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur ces derniers sont mentionnés dans le tableau **08**

Tableau08:Les résultats des analyses bactériologiques effectuées sur le lait infantile « Célia 1^{er} âge »

Germes	Germes/g de lait infantile reconstitué
Mésophiles totaux	A dilution 10 ⁻¹ :21 A dilution 10 ⁻² :18 A dilution 10 ⁻³ :7
Coliformes totaux	Absence
Coliformes fécaux	Absence
Staphylocoques aureus	Absence
<i>Clostridium</i> sulfito- réducteur	Absence
Salmonelle	Absence
Streptocoques fécaux	Absence
Levures et Moisissures	Absence

D'après les résultats obtenus :Le lait adapté Célia 1^{er}âge est d'une excellente qualité hygiénique puisqu'il est exempt de bactéries d'altération et pathogène. En ce qui concerne les mésophiles totaux les résultats montre la présence de 7 germes/g et ceci conforme aux normes (journal officiel N=34, 1998).

Selon **Gill (1997)**, les qualités technologiques des poudres de lait dépendent des modalités de leurs fabrications et des conditions de stockage.

I.4.Confirmation de l'identification de la souche *Bifidobacterium infantis*

I.4.1. La coloration de Gram

Le teste de la coloration de Gram n'a donné que des bactéries colorées en violet. Donc les bifidobactéries sont de Gram positif. Elles ont fixé le violet de Gentiane dans leur cytoplasme même après décoloration avec l'alcool. La paroi de la cellule bifide est dépourvue de composés lipidiques, qui présentent une affinité vis-à-vis de l'alcool.

I.4.2. Le test de la catalase

En ce qui concerne le test catalase effectué sur *Bifidobacterium infantis* est révélé négatif car il n'y a pas eu d'effervescence dans la colonie lors de son contact avec l'eau oxygénée donc il n'y a pas eu de dégagement gazeux (du dioxygène) ainsi la bactérie est dépourvue de catalase.

I.4.3. Résultats d'identification biochimique

Les résultats de confirmation de l'identification biochimique de la souche bifide sont regroupés dans le tableau 09

Tableau09 : Résultats des tests biochimiques par la galerie API 20 E de la souche *Bifidobacterium infantis*

Test	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	T	IND	VP	G	G	MA	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
s	G							D			EL	L	N							
								A				U								
<i>Bfi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>nfan</i>																				
<i>tis</i>																				

L'identification effectuée, toujours en référence aux travaux de **Mitsuoka (1984)**, Nos résultats confirment que cette souche bifide appartient à l'espèce *Bifidobacterium infantis*

I.5. Evolution de pH du lait infantile seul ou enrichi lors de la fermentation

Les bifidobacteries sont caractérisées par leur pouvoir acidifiant, qui apparait par la haute diminution du pH dans le lait seul ou enrichi et cela est dû à la production mixte d'acide acétique et l'acide lactique (voie hétéro fermentaire) ; en effets les bifidobacteries produisent ces deux acides organiques dans un ratio molaire de 3 moles de lactate, 2 moles d'acétate, et cela en métabolisant une grande variété d'hexose par le cycle du fructose-6-phosphate.

Les résultats du suivi de l'évolution du **pH** dans le lait infantile cultivé avec *Bf.infantis* tous les 2 heures pendant 6 heures et après 24heures sont représentés au niveau du tableau 10 et figures n°09

Tableau 10 : Résultats de l'évolution de l'acidification du lait adapté 1^{er} âge (Célia) seul et enrichi avec la Spiruline séchée fermentée par *Bifidobacterium infantis*

Temps pH	pH du lait fermenté + Spiruline	pH du lait fermenté seul
T ₀	7,1	6,8
T ₂	7	6,73
T ₄	6,8	6,64
T ₆	6	6,3
T ₈	5,7	5,79
T ₂₄	4,5	4,99

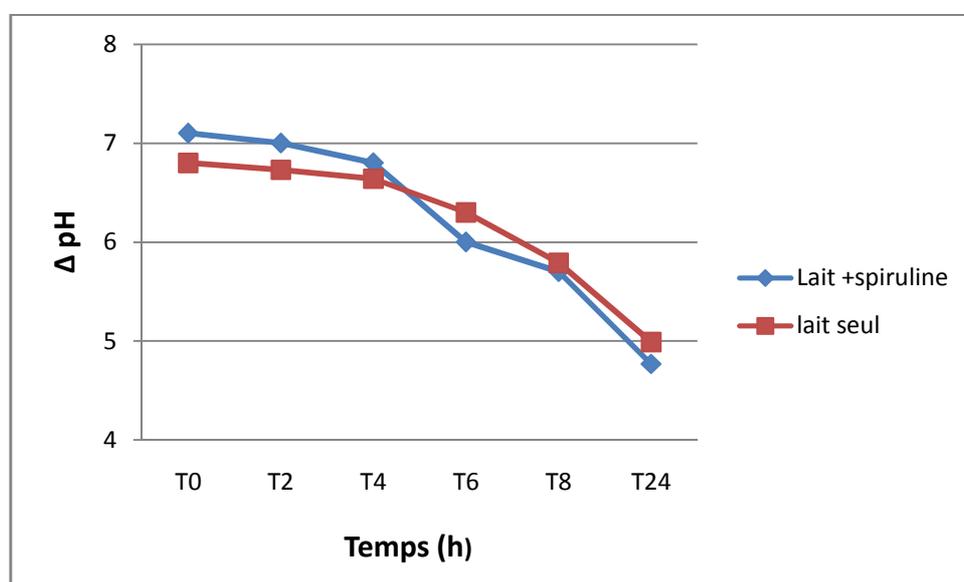


Figure n° 09 : Evolution du pH du lait infantile (Célia) 1^{er} âge seul ou enrichi avec la Spiruline fermentée par *Bifidobacterium infantis*

Chaque 2 heures nous avons noté une diminution de pH, après 8 heures atteignant une valeur de 5,79 pour le lait seul et de 5.70 pour le lait enrichi avec la spiruline.

Le plus bas pH et de **4.50** remarqué dans le milieu de fermentation du lait infantile enrichi avec la spiruline, qui peut s'expliquer par le fait qu'il y'a une forte production de l'acide lactique et acétique liée au métabolisme des hexoses par un grand nombre de bactéries *Bifidobacterium infantis*, donc ce milieu favorise la multiplication de la flore bifide et en parallèle leur métabolisme, c'est-à-dire, production des acides et diminution du pH.

I.6 Evolution des comptes de *Bf.infantis* dans le lait adapté 1^{er} âge (Célia) seul ou enrichi avec la souche Spiruline

Bf.infantis est caractérisée par son haut pouvoir de croissance sachant que théoriquement elle présente un temps de croissance de 100 mn. Les résultats du suivi de cinétique de croissance de la souche bifide dans le lait infantile seul, lait infantile enrichi avec la Spiruline, tous les 2 heures pendant 6 heures et après 24 heures de fermentation sont présentés au niveau des tableaux 11,12

Tableau 11: Détermination des comptes moyens de *Bf. infantis* cultivée dans le lait infantile seul 1^{er} âge (Célia).

Temps	Nombre de colonies de <i>Bf.infantis</i>			
	Nombre des UFC/ml			Log du nombre des UFC/ml
	Dilution décimales			Dilution décimales
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
T ₀	60	20	10	7,56
T ₂	43	40	22	7,57
T ₄	70	23	4	7,62
T ₆	95	45	10	7,80
T ₈	300	180	14	8,33
T ₂₄	Ind	215	35	8,05

Ind : Indénombrable

Tableau 12: Déterminations des comptes moyens de *Bf. infantis* cultivé dans le lait infantile 1^{er} âge (Célia). Enrichi avec la spiruline

Temps	Nombre de colonies de <i>Bf.infantis</i>			
	Nombre des UFC/ml			Log du nombre des UFC/ml
	Dilution décimales			Dilution décimales
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-6}
T ₀	50	10	4	7,65
T ₂	40	17	8	7,40
T ₄	75	35	10	7,69
T ₆	115	40	7	7,84
T ₈	230	65	12	8,12
T ₂₄	300	Ind	Ind	8,43

Ind : Indénombrable

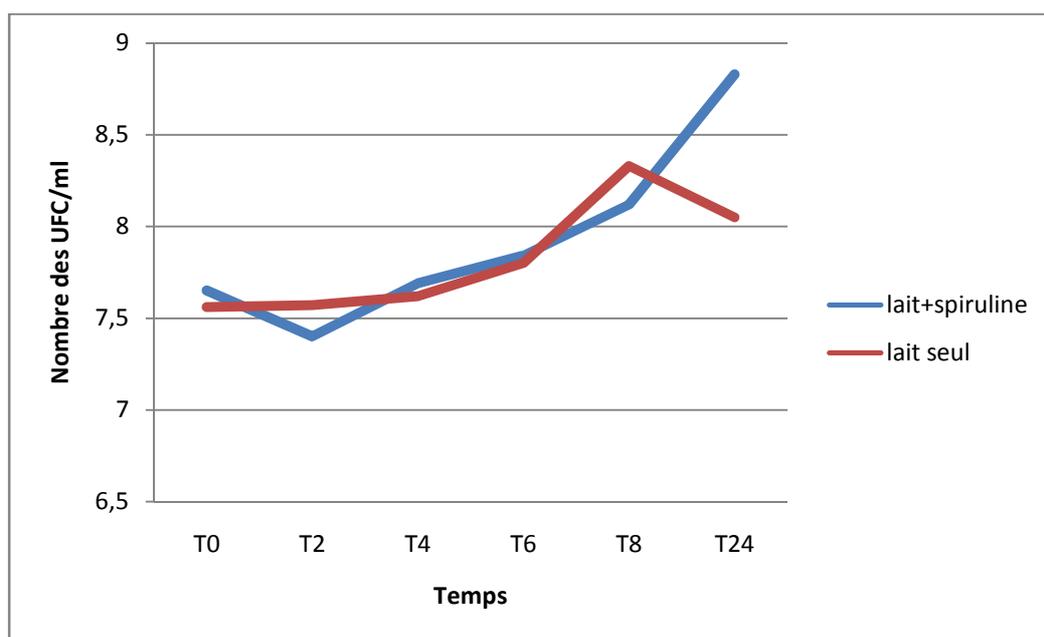


Figure n° 10 : Cinétique de croissance de *Bf.infantis* cultivé dans le lait infantile (Célia) 1^{er} âge seul et enrichi avec la spiruline.

I.7 Les résultats de la cinétique de la croissance suivi tous les 2 heures et après 24 heures :

D'après ces résultats obtenus, nous remarquons que le nombre des UFC de *Bifidobacterium infantis* augmente pour les deux milieux de lait, en effet on atteint après 6h d'incubation un nombre de 115.10^6 UFC/ml pour le lait infantile enrichi avec la spiruline et de 95.10^6 pour le lait infantile seul.

Les calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de *Bf. infantis* cultivée dans le lait adapté 1^{er} âge seul et enrichi avec la spiruline sont mentionnés dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (v pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) de *Bifidobacterium infantis* cultivé dans le lait adapté 1^{er} âge seul ou enrichi avec de la spiruline.

Milieu de fermentation	Δ pH	V Ph	G	μ
Lait infantile Seul	1,81	$7,10^{-2}$	4,88 (mn)	$0,38$ (mn⁻¹)
Lait infantile enrichi avec la Spiruline	2,33	$97, 10^{-2}$	2,60 (mn)	$0,20$ (mn⁻¹)

Selon les résultats du tableau N°14 le milieu lait infantile enrichi avec la spiruline est le meilleur milieu dans lequel la souche *Bifidobacterium infantis* à un temps de génération de **2,60 mn** soit **0,20** division par minute. Avec une vitesse d'acidification de **$97, 10^{-2}$ mUpH/mn**.

I.8. Résultats de la sensibilité de la souche *Bifidobacterium infantis* aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité de la souche bifide vis-à-vis de 6 antibiotiques (Ampicilline, Streptomycine, Triméthprime etc.) sont représentés au niveau de tableau 15.

Tableau 14 : Résultats de la sensibilité de la souche *Bifidobacterium infantis* aux antibiotiques

Code	Antibiotiques	Diamètre(mm)	Sensibilité
AMC	Ampicilline	35	S

S	Streptomycine	10	S
C	Chloramphénicol	30	S
CL	Colistin	10	R
SXT	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	20	S
OX	Oxacilline	15	S

R : Résistant

S : Sensible

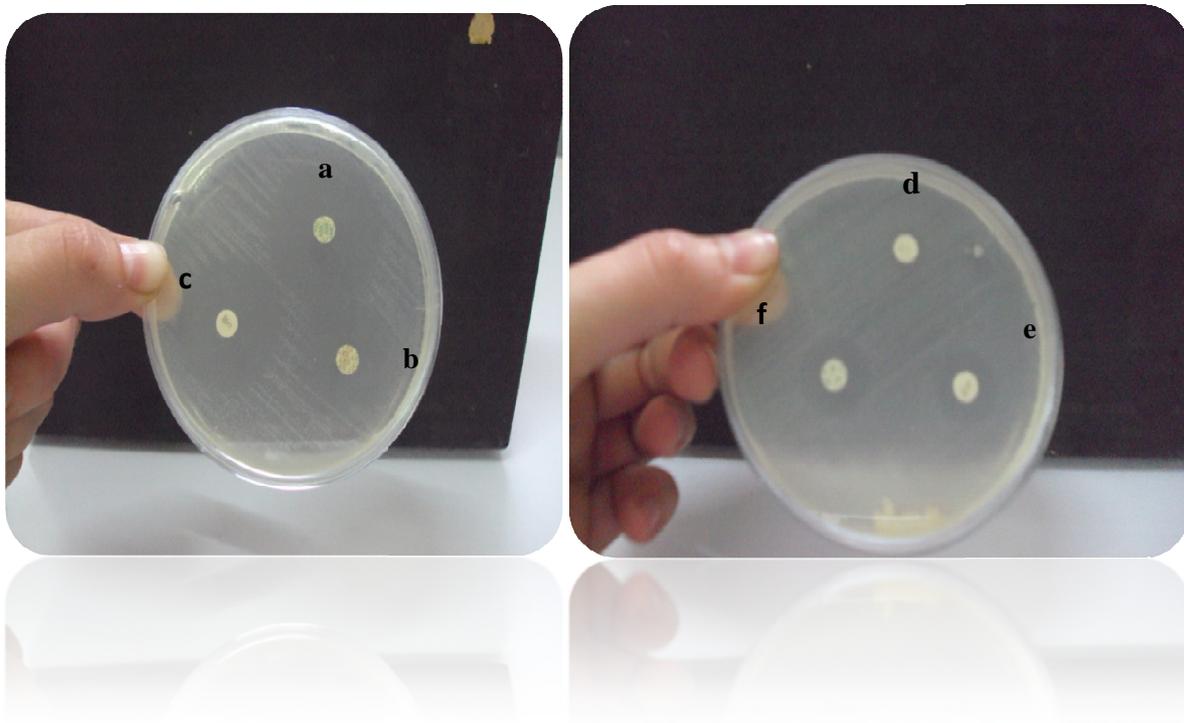


Figure n°11: Spectre d'action de quelques antibiotiques vis-à-vis *bifidobacterium infantis*

(Photographie originale)

A droite :

d : Effet de Colistin sur les *Bf. infantis*

e : Effet d'Oxacilline sur les *Bf. infantis*

f : Effet de Streptomycine sur les *Bf. infantis*

A gauche :

a : Effet d'Ampicilline sur les *Bf.infantis*

b : Effet d'Thriméthprime/ Sulfaméthoxazole sur les *Bf.infantis*

c : Effet d'Chloramphénicol sur sur les *Bf.infantis*

D'après les résultats d'antibiogramme, nous remarquons que la souche *bifidobacteriuminfantis* est résistante à l'antibiotique : Colistin, et elle est sensible aux antibiotiques tel que : Chloramphénicol, Ampicilline, Streptomycine, Chloramphénicol, Triméthprime/ Sulfaméthoxazole, Oxacilline.

II. Discussion

Les bifidobactéries sont considérées comme des microorganismes nutritionnellement prétentieux, parce que pour leur culture il faut qu'on assure des facteurs de croissance spécifiques. Ainsi les peptides sont considérés comme des sources d'azote adéquates pour la croissance des bifidobactéries (**Barascu, 2006**).

D'après les résultats obtenus nous remarquons que la culture de l'espèce *Bf. infantis* dans le lait infantile enrichi avec la spiruline en raison de 1% donne de meilleurs résultats sur l'effectif des colonies bifides que dans le lait infantile seul, et aussi le lait se signifie que c'est un milieu qui stimule la croissance de *Bf. infantis*.

Nous avons remarqué aussi qu'à partir de temps T_6 on voit une croissance de la souche bifide et T_{24} est le meilleur temps dans lequel on note la croissance la plus élevée de *Bf. infantis* dans les deux milieux de fermentation. Sachant que le milieu lait enrichi avec la spiruline donne la valeur maximale de croissance ($8,42 \cdot 10^6$ UFC/ml), donc cette souche bifide s'adapte bien avec la spiruline, et qu'à T_8 nous sommes en pleine phase exponentielle de croissance de cette souche.

Les laits infantiles contenant les bifidobactéries possèdent de nombreux avantages nutritionnels et technologiques (**Samona et al., 1996**). **Bezkorovainy (2001)** a rapporté que les facteurs bifidogènes peuvent optimiser la croissance des bifidobactéries dans l'intestin. D'autre part en présence de la spiruline, la capacité des souches bifides à croître sur milieu lait étant donné que leur phase de latence est raccourcie à seulement 2 h (**Samona et al., 1996**) Et comme nous avons cité auparavant, la spiruline est une micro-algue aux propriétés étonnantes, très riches en nutriment 70% de protéine. Elle en contient de 60 à 70% et aussi des acides aminés essentiels à un pourcentage de 47%. Qui sont tout assimilables.

On peut conclure à partir des résultats de cet expérience que les besoins de cette souche bifide en source d'azote assimilable lié à son activité protéolytique faible remède par la présence de tous les acides aminés et protéines facilement assimilable de la spiruline qui est en synergie avec le lait infantile. Et n'oublions pas que cette Spiruline fournit aussi des éléments minéraux et des vitamines aident à la croissance des souches (sa forte teneur en Fer).

En ce qui concerne l'activité fermentative des bifidobactéries, nous avons observé qu'elle avait été faible pendant les premières heures d'incubation et elle en corrélation avec la croissance des bifidobactéries à cette période, le fait que nous avons noté une chute du pH remarquable dans les deux milieux après 24h d'incubation à 37°C, soit 4,50 dans le milieu

lait enrichi avec la Spiruline, nous permet d'affirmer que la Spiruline à un effet stimulateur sur l'activité fermentative des souches bifides.

Ces résultats sont comparables à celle de **Tsuchihashi** a montré en 1987 que l'ajout de 5% de Spiruline dans l'alimentation augmentait de 3 fois la population des Lactobacillus des intestins de rats. Chez les humains, les Lactobacillus sont connus pour leurs 3 fonctions majeures : ils facilitent la digestion et l'absorption des nutriments, protègent contre les infections et stimulent le système immunitaire. Chez les malades du SIDA, une mauvaise absorption des aliments associés à un terrain opportun aux infections ne font qu'augmenter l'expression des symptômes de la maladie. C'est pourquoi un complément en Spiruline est recommandé pour maintenir la population de Lactobacillus et ainsi ralentir la progression du virus.

Dans l'objectif de contribuer à l'amélioration de la santé de la population grâce à L'utilisation de la Spiruline. Elle serait intégrée dans un programme diversifié de lutte Contre la malnutrition. Sa culture locale montrerait aux populations qu'elles peuvent agir Sur leur développement. La Spiruline ne fait cependant pas partie du protocole officiel de Traitement de la malnutrition, la Spiruline apporterait aux enfants un regain d'appétit, est reçue comme un bienfait par les mères qui la considèrent comme une « vitamine ». Les médecins lui attribuent une action préventive à la malnutrition lorsqu'il est possible de se la procurer localement en complément de la nourriture de base. Ils l'utilisent à raison d'une cuillerée de 2 à 3g /35 jour. Au Centre de Traitement Ambulatoire (CTA) de Ouagadougou elle est prescrite par trois médecins en accompagnement des traitements aux Anti Rétro-Viraux (ARV), aux personnes atteintes du VIH SIDA. Elle apporterait 1) un gain de poids 2) un gain en lymphocytes CD4 3) une diminution des infections opportunistes. Plusieurs travaux de recherche ont été publiés par **Simpore et al. (2007)**, le plus récent portant sur les effets de la Spiruline sur les défenses immunitaires des enfants malnutris atteints du VIH. Le Ministère de la santé a lancé une série d'études épidémiologiques et cliniques sur l'efficacité de la Spiruline. Des recherches sur l'amélioration de la culture de Spiruline sont en cours.

Dans le chapitre «Essais nutritionnels chez l'homme» de **Flaquet&Hunri(2006)**, des expériences positives de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline sont rapportées. Parmi celles-ci :

- ✚ L'expérience de renutrition infantile portant sur près de 600 enfants de Bangui (RCA) de 0-5 ans, avec un mélange de 5g Spiruline+ sardine (**Dupire 1998**)
- ✚ L'expérience de réhabilitation nutritionnelle comparative portant sur 84 enfants HIV positifs et 86 HIV-négatifs (**Simpore et al., 2006**) montrant l'impact favorable de la Spiruline dans la renutrition d'enfants infectés par le virus du SIDA.

Conclusion

Conclusion générale

Bifidobacterium infantis est une souche qui a été isolée à partir des selles de nourrissons allaités exclusivement au sein. Le milieu MRS représente un bon milieu de culture pour la croissance de notre souche d'intérêt.

Deux milieux de culture ont fait l'intérêt de notre étude : lait infantile 1^{er} âge (Célia) seul et lait infantile 1^{er} âge enrichi avec la spiruline.

Une optimisation de la croissance ainsi que le pouvoir acidifiant de la souche ont été obtenus dans le lait infantile 1^{er} âge (Célia) enrichi avec la Spiruline ceci peut être expliqué par les facteurs fonctionnels contenus dans la Spiruline ainsi que sa richesse en éléments nutritifs indispensables à la croissance de *Bifidobacterium infantis*.

Un suivi du pouvoir acidifiant tous les 2h et pendant 24 h pour la souche *bifidobacterium infantis* montre que la souche présente un pouvoir acidifiant très appréciable ($\Delta \text{pH} = 1,81$) après 24 h de fermentation dans le lait infantile 1^{er} âge seul et de **2,33** pour le lait infantile enrichi avec la spiruline.

Concernant le suivi de la cinétique de croissance de la souche montre qu'il y a une augmentation de biomasse avec un taux de croissance de $0,20 \text{ mn}^{-1}$ et un temps de génération de l'ordre de 2,60mn lorsqu'elle est cultivée dans le lait infantile enrichi en spiruline.

D'après nos résultats l'ajout de spiruline en raison de 1% dans le lait infantile d'un nourrisson améliore significativement la croissance de la souche bifide.

En perspective, la spiruline peut être utilisée en alimentation infantile au tant que complément alimentaire en raison de ses valeurs thérapeutique idéal et aussi comme fortifiant, dont on peut l'utiliser aux traitements de diverses pathologies en se basant sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants. Elle devrait être administrée très tôt chez le nourrisson et le jeune enfant pour empêcher l'installation des carences qui surviennent surtout à partir du sevrage et tout ce qui est pathogène, elle rééquilibre la composition de la flore intestinale en favorisant l'implantation des bifidus en raison de sa richesse en fibres et en glucosamine.

Il serait intéressant aussi de réaliser des études ultérieures sur la quantité adéquate de la spiruline qui doit être ajoutée ou combinée au lait infantile. Ces mêmes études pourraient évaluer l'aptitude de cette micro algue à se combiner à différents aliments notamment ceux

Conclusion

qui jouent un rôle curatifs ou qui peut être spécifiés aux gens malades comme par exemple le yaourt. Il serait intéressant d'utiliser la spiruline dans la lutte thérapeutique ou préventifs vis a vis des maladies d'origine alimentaire et autres.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Ballongue, J.**, "Bifidobacteria and probiotic action", In Lactisacidbacteria, Eds. Salminen S. et Von Wright A., Dekker M., New York, (1993), 357-432.
- Barascu,2006** : Influence de certaines sources de nutriments et de facteurs de croissance sur la viabilité des bifidobactéries p : 200- 220.
- Bezkorovainy, A.**, —Probiotics: determinants of survival and growth in the gut□, Am. J. Clim., Nutr., (2001), 73 : 3998 - 4058.
- Bezkorovainy, A.,2001** —Probiotics: determinants of survival and growth in the gut□, Am. J. Clim.,
- Bourgeois C.M., Mescle. J.F et Zucca. J,(1990)** – Microbiologie alimentaire ; Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Technique et Documentation – Lavoisier, Condé Sur Noireau.
- Bourlioux, P.**, —Écologie microbienne du tractus digestif humain, Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologies, Lorica, (1994), 369 - 381.
- Bruno F.A. and Shah N.P.2002-** Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganismes by *Bifidobacterium* sp. *Milchwissenschaft*.57 : 617- 621.
- Bujard, E.U., Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., wuhrmann, J.J. and Charpy, L., José Langlade, M. et Alliod, R.**, « La spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? », (2008), P 49.
- Chouraqui, J.**, "Flore intestinale et troubles digestifs chez le nourrisson", (2002), disponible sur l'adresse : http://www.lesjta.com/article.php?ar_id=438
- Deng Y .,Ryu J.H., Beuchat L.R.1999-** Tolerance of acidadapted and non adapted *Echerichia coli* 0157 :H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. *J Appl Microbiol*.88 :203-210.
- Descheemaeker, K.**, —Les probiotiques□, Nutri& phytothérapie, Edit. Louvain Garant Belgique, (2000)
- Dupire J.1998-** Objectif : malnutrition. Paris : Similia : 224.
- Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharides from *Spirulina platensis* , on antiviral activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49 :108-110.

- Flaquet J . 1996-** Spiruline : aspects nutritionnels. Antenna technologies : 22-53p : In : <http://www.antenna.ch/aspects Nutri.htm>
- Flaquet J., Hunri J.P.2006-** Spiruline,Aspect Nutritionnels. Antenna technologies :41p :
- Fooks L.J., and Gibson G.R.2002-** Probiotics as modulators of the gut flora.Br J Nutr.88 :S39-S49.
- Fox, R.D.,** —Spiruline, Technique pratique et promesse□, Edisud, Aix en Provence, (1999), Page 8 sur 10.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B.** —Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics□, J. Nutr. 125, (1995), 1401-1412
- Gill H.S 2003-** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best Pract Res Clin Gastroenterol.17 :755-773.
- Giraud (J-P),** (2003) – Microbiologie alimentaire ; Tome 2 .ed . Paris : edDunod.
- Guiraud J, Galzi P , 1980 :** les analyses microbiologiques dans les industries alimentaires. ED. Usine nouvelle, Paris.
- Joffin, Christiane. Joffin, Jean-Noël.** Microbiologie alimentaire. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Biologie technique. 1999. n°ISBN : 2-8661-7342-2. Page 21
- Johnson P. and Shubert, E.,** —Availability of iron to rats from spirulina, a blue- green algae□, Nutrition Research, V. 6, (1986), 85-94.
- Kiet PQ, Durand-Chastel H (2006)** Spirulina rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids. In International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development : 111-117
- Leveau J.Y., Buix M, (1993)-** Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel ; Paris : Ed technique et Documentation- Lavoisier : 520p.
- Lwata k, Inayama T, Kato T, (1990)** – Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose – induced hyperlipidemic rats, J. Nutr. Sci. Vitaminol. V. 36 ;p. 165-171.
- Mercenier A., Pavan S., and Pot B.2003-** Probiotics as biotherapeutic agents : Present Knowledge and future prospects, *Curent Pharmaceutical Design* 9, pp. 175-191
- Mitsuoka T.1984** – Taxonomy and ecology of bifidobacteria. and microflora, Vol 3 no 1 pp.11-28.

- Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S. and Kim H.Y. 2006** – Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology* 100, pp. 1171 _1185.
- Perez R. 1997** – Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Edition IFREMER.
- Petschow, B.W., Talbott, R.D.**, “Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk”, *Journal of Clinical Microbiology*, (1991), 28, 287-292.
- Picard C., Fioramonti J., François A., Robinson T., Neant F., Matchuchansky C. 2005**- Review article : bifidobacteria as probiotic agents _ physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.* 22 : 495 – 512.
- Prescott, (1995)** – Microbiologie, Lavoisier : 45p.
- Roberfroid M. 2001**- Prebiotics : preferential substrate for specific germs ? *American Journal of Clinical Nutrition* 73(suppl) : 406S-409S.
- Roberfroid M., Vanloo J. and Gibson G 1998**- The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* 128 (1) :11-19.
- Romond, M.B. et Romond, C.**, — Bifidobactéries et facteurs bifidogènes. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques, Loriga, (1994), 439 - 452.
- Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehuae et Kuakiwi, N.**, "Resultats d'un essai de rehabilitation nutritionnelle avec la spiruline à Dakar (a propos de 59 cas) ", *Medecine d'Afrique Noire*, V. 46, n°3, (1999), 143-146.
- Salminen S., Isolauri E. and Salminen E. 1996**- Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier : successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70,347-358.
- Samona, A., Robinson, R.K. et Marakis, S.**, — Acid production by Bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk”, *Food Microbiology*, 13, (1996), 275-280.
- Scardovi, V.**, "Bifidobacterium. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 9th ed., Willams and Wilkins, Baltimore, (1986).
- Servin A. 2004**- Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbial Rev.* 28 : 405-440.
- Servin A.L. and Coconnier M.H. 2003** – Adhésion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17 :741-754.

Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., Biondi, D., Ruberto, G., Musumeci, S., —Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and MISOLA□, *Nutr. J.*, 23, 5 (1), 3, (2006)

Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P.B. and Ross R.P. 2001- Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483. Sud, (1999), 246 p.

Tabutine I, Pierre-Yves G, Pierre M, (2002)- la spiruline contre la malnutrition (Madruieinde), antenna technologie (Suisse). Antenna trust (Inde) :24p

Tannock G.W. 1995- Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 5 :1059-1070. technological aspects of milks fermented by "*Bifidobacteria*", *J. of dairy research*, (1995), 68: 151- 187.

Tsuchihashi, N., Watanabe, T. and Takai, Y., "Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats", *Bull. Chiba Hygiene College, Chiba. Japan.* V. 5, (1987), 27 30

Vidalo J.L. 2008- Spiruline l'algue bleue de santé et de prevention. ED. Dauphin :

Wittrock, et Nordstedt, "Algae aquaeducta exsicc, fascicule XIV",

Description systematicae dispositae, n° 679, (1844), 59 p.

Annexes

Annexe07

Tableau 15

Composition de lait adapté 1er âge « Célia » indiqué sur l'emballage

COMPOSITION MOYENNE		100 ml reconstitution à 13,5%	100g de poudre
Energie	KJ	290	2145
	Kcal	69	513
Protéines	g	1,5	11,2
Caséine	g	0,6	4,4
Protéines de sérum	g	0,9	6,8
Glucides	g	7,5	55,8
Lactose	g	6,2	46,2
Maltodextrines	g	0,2	1,6
Amidon	g	1,1	8,0
Lipides	g	3,7	27,2
Acide linoléique	mg	608	4500
Acide α -linoléique	mg	101	750
Minéraux			
Sodium	mg	16,2	120
Potassium	mg	62,1	460
Chlorite	mg	43,2	320
Calcium	mg	64,8	480
Phosphore	mg	43,2	320
Magnésium	mg	5,4	40,0
Fer	mg	0,7	5,5
Zinc	mg	0,7	5,0
Manganèse	μ g	8,1	60,0
Cuivre	μ g	47,3	350
Iode	μ g	10,8	80,0
Sélénium	μ g	1,5	11,0
Vitamines			
A	μ g RE	81,0	600
D	μ g	1,4	10,2
E	mg A-TE	0,7	5,5
K	μ g	8,1	60,0
C	Mg	10,8	80,0
Thiamine (B1)	μ g	67,5	500
Riboflavine (B2)	μ g	135	1000
B6	μ g	60,8	450
B12	μ g	0,2	1,2
Niacine	μ g	743	5500
Acide folique	μ g	13,5	100

Annexes

Acide pantothénique	µg	405	3000
Biotine	µg	2,0	15,0
Choline	mg	8,1	60,0
Inositol	mg	3,4	25,0
L-camithine	mg	1,5	11,0
Taurine	mg	6,8	50,0

Annexes

Annexes 01

Tableau 1 : Composition de la spiruline (*Spirulina maxima*) en acides aminés en g pour 100g de matière sèche (Bujard et al., 1970)

Acides aminés non essentiels (en g)	Isoleucine	Leucine	Méthionine	Lysine	Tryptophane	Valine
Teneurs (g)	3,5	5,4	1,4	2,9	9,0	4,0

Acides aminés essentiels (en g)	Alanine	Acide Aspartique	Arginine	Cystéine	Glycine	Histidine	Proline	Sérine	Tyrosine
Teneurs (g)	4,8	6,1	4,3	6,0	3,2	1,0	2,7	3,2	3,0

Tableau 2 : Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de spiruline (Flaquet et Hurni, 2006)

Vitamines hydrosoluble	B1	B2	B3	B5	B6	B8	B9	B12	C
Teneur	34-50	30-46	130	4,6-25	5-8	0,05	0,5	0,10-0,34	Traces

B1= Thiamine, B2 =Riboflavine, B3 =Niacine, B5 =Pantothénate, B6 =Pyridoxine, B8 =Biotine, B9 =Folate, B12 =Cobalamine, C =Acide ascorbique

Vitamines liposolubles	Provitamine	Cryptoxanthine	Vitamine E (Alpha-tocophérol)
Teneur	700-1700	100	50-190

Annexes

Tableau 3 : Teneurs en pigments exprimées en mg/100g de matière sèche de *Spirulinaplatis*(Tabutine et al.,2002)

Pigments	Teneurs en mg/100g de matière sèche
Chlorophylles totales	115
Chlorophylle a	61-75
Caroténoïdes (orange)	37
Phycocyanine (bleu)	1500-2000
Phycoérythrine (rouge)	2900-10000

Tableau 4 : Teneur en minéraux de spiruline cultivée (en µg/10g de sa matière sèche) (Flaquet et Hurni,2006)

Minéraux	Teneur	Minéraux	Teneur
Calcium	1300-14000	Cuivre	8-10
Phosphore	6700-9000	Chrome	2.8
Magnésium	2000-2900	Manganèse	25-37
Fer	580-1800	Sodium	4500
Zinc	21-40	Potassium	6400-15400

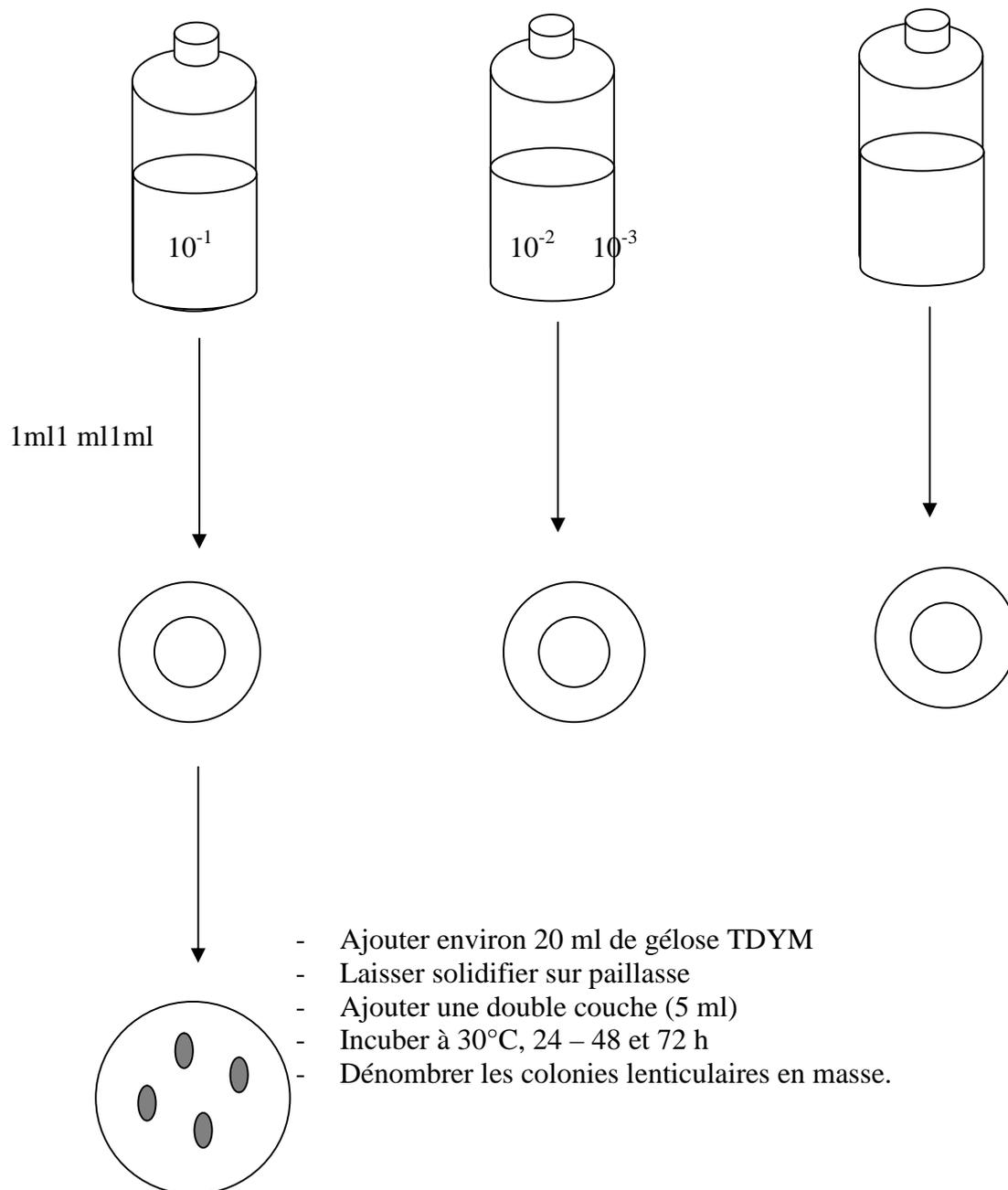
Tableau 5: Les principaux microorganismes à effets probiotique (Holzapfel et al., 2001)

<i>Lactobacillus.s</i> <i>p</i>	Bifidobacterium.sp	Autres bactéries lactique	Autres microorganismes
<i>L.acidophilus</i>	<i>Bf.adolescentis</i>	<i>Enterococcusfaecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L.casei</i>	<i>Bf.animalis</i>	<i>Enterococcusfaecium</i>	<i>E.coli</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>Bf.bifidum</i>	<i>Lactococcuslactis</i>	<i>Propionibacteriumsp</i>
<i>L.bulgarcicus</i>	<i>Bf.infantis</i>	<i>Leuconstocsp.</i>	<i>Sachromycesboulardii</i>
<i>L.gallinarum</i>	<i>Bf.lactis</i>	<i>Pediococcusacidilactic</i>	
<i>L.gasseri</i>	<i>Bf.longum</i>	<i>Sporolactobacillusinulis</i>	
<i>L.johnsonii</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L.paracasei</i>			
<i>L.plantarum</i>			

Annexes

Annexe 04

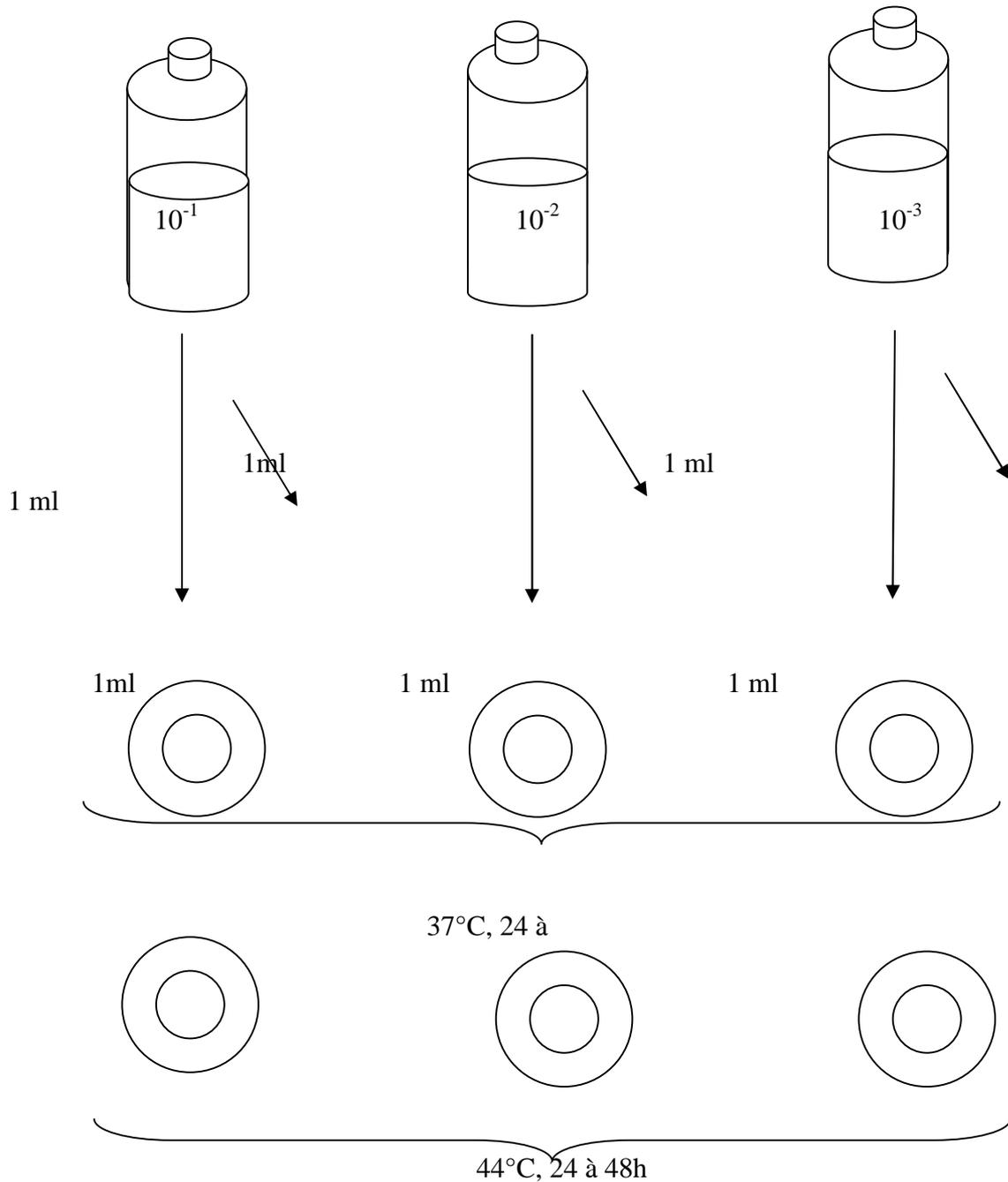
A partir des dilutions décimales :



**Figure n° 11: Recherche et dénombrement des germes aérobies
Mésophiles totaux**

Annexes

A partir des dilutions décimales :



Ajouter auparavant environ 20 ml de gélose VRBL. Laisser solidifier sur pailleasse

Dénombrer les colonies fluorescentes ayant poussé en masse

Colonies rouge ou violet

Figure n°12: Recherche et dénombrement des Coliformes en milieu solide

Annexes

A partir des dilutions décimales :

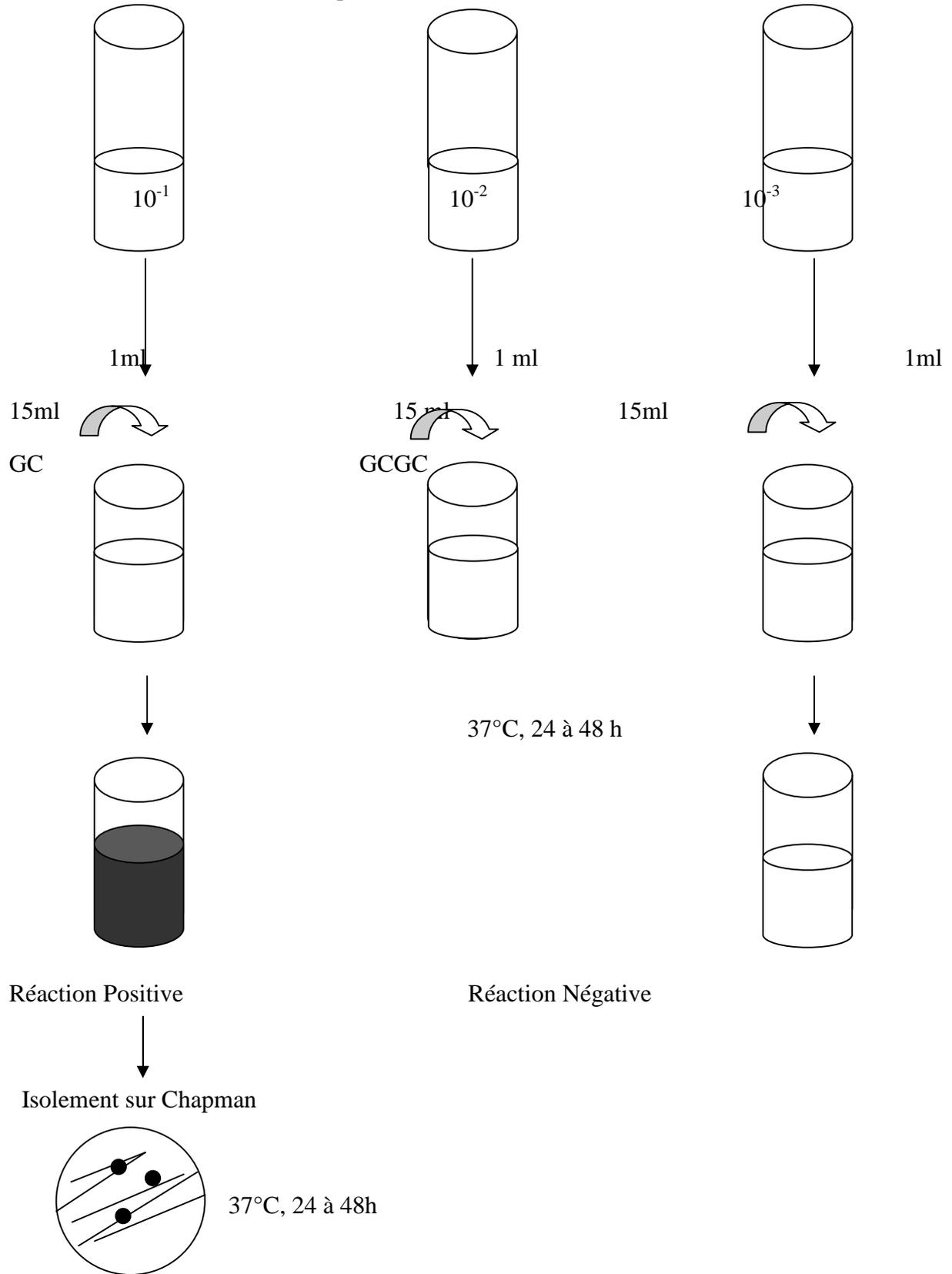
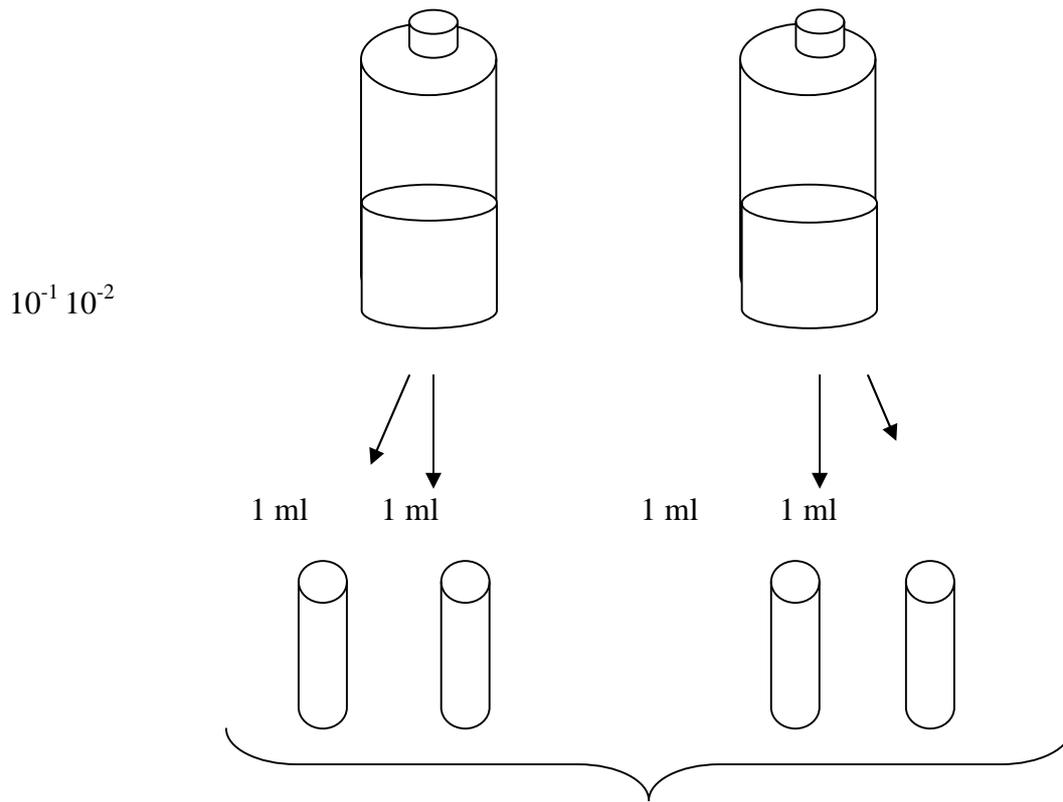


Figure n°13 : Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

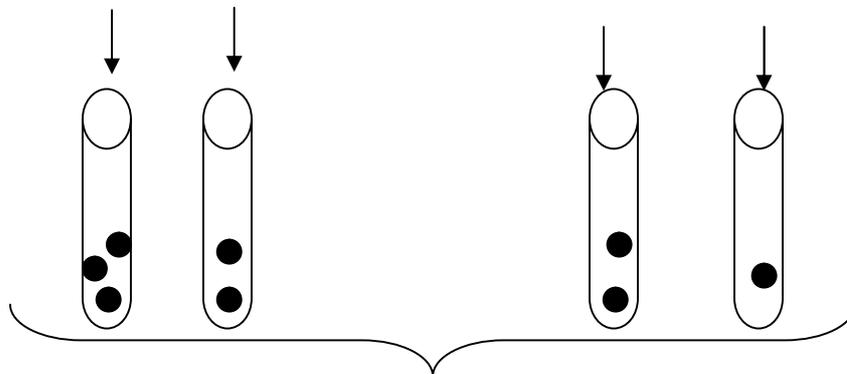
Annexes

A partir des dilutions décimales :



Ajouter 15 ml de gélose V F par tube

Laisser solidifier sur paillasse, puis incuber à 37°C, 48h.



**Figure n°14 : Recherche de spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs
Et de *Clostridium perfringens***

A partir des dilutions décimales:

Annexes

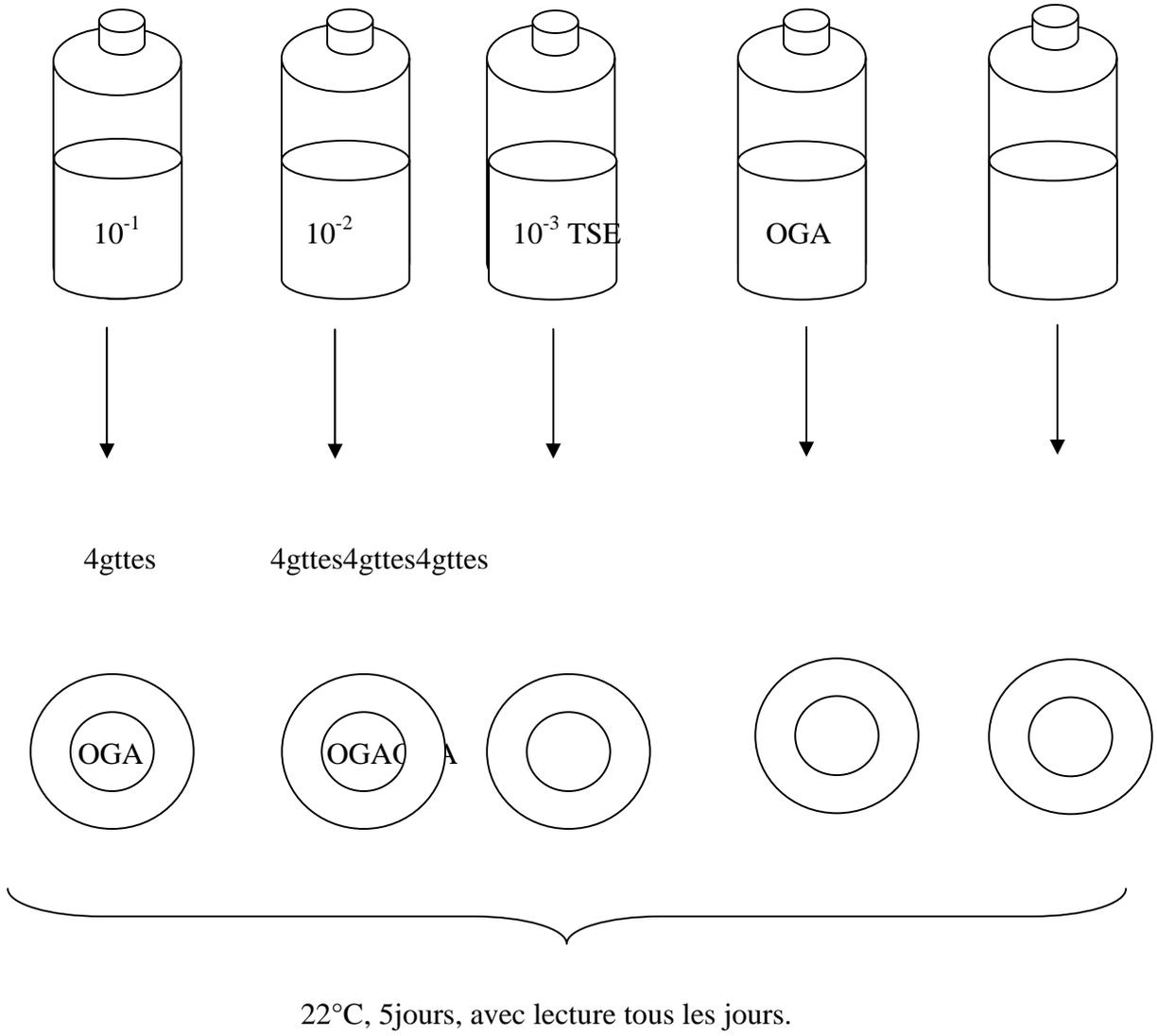
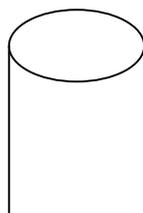


Figure n°15 : Recherche et dénombrement de Levures et Moisissures

Solution mère



Annexes

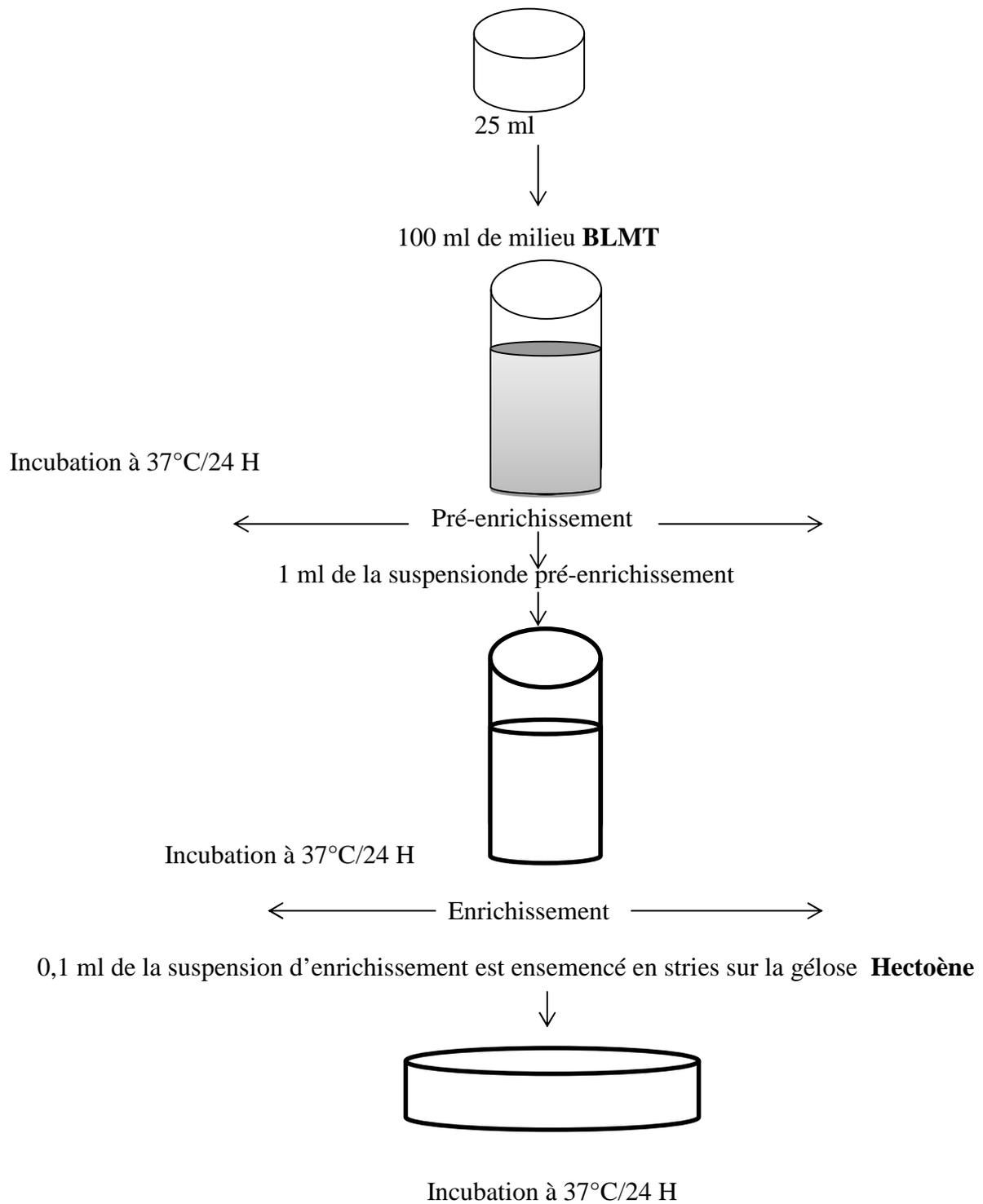


Figure n°16: Recherche et dénombrement des salmonelles des souches bifides

Annexes

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
<u>ADH</u>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<u>ODC</u>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>CIT</u>	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vertpâle/jaune	Bleu-vert/vert
<u>H2S</u>	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
<u>URE</u>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophanedésaminase	TDA / Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
<u>VP</u>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
<u>GEL</u>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune

Annexes

			vert	
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/ oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu- vert	Jaune

Annexes

Appareillages et verreries

Appareillages

- ✓ Four Pasteur
- ✓ Étuve d'incubation (30, 37, 44 °C) de type PRODILAB France
- ✓ Balance analytique de type METTLER TOLEDO
- ✓ Microscope optique de NOVEX HOLLAND
- ✓ Autoclave de type AVX Electronic
- ✓ Réfrigérateur à 4°C. pour le stockage des milieux de cultures et des échantillons
- ✓ pH mètre de type HANNA
- ✓ bain Marie

Verreries

- ✓ Pipettes graduées : 5, 10 et 25 ml
- ✓ Pipettes Pasteur
- ✓ Tubes à essais
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Bécher
- ✓ Burette
- ✓ Eprouvette graduée
- ✓ Entonnoir
- ✓ Lames et lamelles du microscope
- ✓ Lamelles
- ✓ Fioles

Annexes

Annexe 08



Figure n°17 : La spiruline



Figure n°18 : lait infantile (Célia 1^{er} âge)



Figure n°19 : La galerie Api 20 E



Figure n° 20 : Autoclave



Figure n° 21 : Compteur de colonies

Figure n° 22 : Etuve à 37°C

Annexes



Figure n° 23 :Microscope optique



Figure n° 24 :Bec bunsen



Figure n°25 : Bain Marie



Figure n°26 : Incubateur